



# 慢性糸球体疾患の診断と腎機能評価を目的とした尿中バイオマーカーの検索

著者	樋渡 昭
発行年	2015
学位授与大学	筑波大学 (University of Tsukuba)
学位授与年度	2014
報告番号	12102甲第7432号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2241/00127764">http://hdl.handle.net/2241/00127764</a>

「慢性糸球体疾患の診断と  
腎機能評価を目的とした  
尿中バイオマーカーの検索」

2 0 1 4

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

樋渡 昭

## 目次

1 緒言 .....	1
1-1 成人の腎疾患について .....	1
1-2 尿中バイオマーカーとは .....	2
1-3 糸球体上皮細胞(ポドサイト)の特徴 .....	2
1-4 mtDNA の尿中排泄の意義 .....	3
1-5 メガリンの尿中排泄の意義 .....	5
2 研究①「尿中脱落ポドサイト、尿中ポドカリキシン、尿中脱落ポドサイト中 mtDNA、尿中mtDNA、尿中メガリンの腎疾患における診断・病勢マーカーとしての有用性の検討」 .....	7
2-1 目的 .....	7
2-2 対象 .....	7
2-3 方法 .....	7
2-3-1 サンプル .....	7
2-3-2 尿中脱落ポドサイト数の測定 .....	8
2-3-3 尿中ポドカリキシン定量 (ELISA) .....	8
2-3-4 尿中脱落ポドサイト中の mtDNA 定量 (qPCR) .....	9
2-3-5 尿中 free mtDNA 量測定 (qPCR) .....	9
2-3-6 尿中メガリン定量 (ELISA) .....	9
2-3-7 その他のマーカー測定 .....	10
2-3-8 統計解析方法 .....	10
2-4 結果 .....	10
2-4-1 尿中脱落ポドサイト数と尿中ポドカリキシン排泄量の検討 .....	10
2-4-2 尿中脱落ポドサイト中の mtDNA 量の検討 .....	11
2-4-3 尿中 free mtDNA 量の検討 .....	11
2-4-4 膜性腎症における尿蛋白、eGFR と各マーカーの関係 .....	12

2-5	考察 .....	12
2-5-1	腎疾患におけるポドサイト関連検査の鑑別マーカー、疾患活動性マーカーとしての有用性の検討 .....	12
2-5-2	尿中 mtDNA 測定の意義 .....	13
2-5-3	糸球体疾患における随時尿中 A メガリンの腎機能推算マーカーとしての可能性 .....	15
2-6	結語 .....	15
3	研究② 「膜性腎症における尿上清ポドカリキシンと尿中脱落ポドサイトの病勢・鑑別マーカーとしての有用性とポドカリキシン排泄のメカニズムの検討」 .....	16
3-1	目的 .....	16
3-2	対象 .....	16
3-2-1	膜性腎症の病勢毎の尿上清中のポドカリキシン排泄量の比較検討 .....	16
3-2-2	膜性腎症と成人ネフローゼ症候群の比較検討 .....	16
3-3	方法 .....	17
3-3-1	サンプル .....	17
3-3-2	尿上清中ポドカリキシン (sup-PCX) 定量 (ELISA) .....	17
3-3-3	尿中脱落ポドサイト数の測定 .....	17
3-3-4	超遠心上清中ポドカリキシン (ultra-sup-PCX) 定量 .....	17
3-3-5	ポドサイトの微絨毛変化の評価 (電子顕微鏡的検討) .....	18
3-3-6	統計解析方法 .....	18
3-4	結果 .....	18
3-4-1	膜性腎症患者における疾患活動度と尿上清中ポドカリキシン排泄量の検討 .....	18
3-4-2	ネフローゼ症候群における鑑別診断マーカーとしての尿上清中ポドカリキシン排泄量の検討 .....	18
3-4-3	膜性腎症における尿上清中ポドカリキシン排泄機構の検討 .....	19

3-5	考察 .....	19
3-5-1	糸球体疾患における尿脱落ポドサイト数と尿上清中ポドカリキシン排泄量の疾患活動性マーカー、鑑別マーカーとしての有用性について.....	19
3-5-2	膜性腎症における尿上清ポドカリキシン排泄のメカニズムについて .....	20
3-6	結語.....	22
4	今後の課題 .....	23
5	謝辞.....	24
6	参考文献.....	25
7	図表 .....	29

## 略語

mtDNA : ミトコンドリア DNA

ELISA : Enzyme-linked immuno-sorbent assay, 酵素結合免疫吸着法

Sup-PCX : Supernatant-PCX : 尿上清中ポドカリキシン

NAG : N-アセチルグルコサミニダーゼ

qPCR : Quantitative polymerase chain reaction, 定量的核酸増幅法

eGFR : estimated glomerular filtration rate, 推算糸球体濾過量

AKI : Acute kidney injury, 急性腎障害

KIM-1 : Kidney injury molecule-1, 腎障害因子-1

NGAL : Neutrophil gelatinase-associated lipocalin, 好中球ゼラチナーゼ結合性リポカリン

L-FABP : Liver-type Fatty acid binding protein, 肝型脂肪酸結合蛋白

## 1 緒言

### 1-1 成人の腎疾患について

高齢化が進み年々慢性腎不全から透析導入となる患者が増加している。日本透析医学会の報告によると 2012 年末の我が国の透析人口は 310,007 人であるが、2012 年の透析導入患者の原因疾患として最も多いのは糖尿病性腎症で 44.2%、次いで漸減傾向にあるものの慢性糸球体腎炎が 19.4%である。その次に多い原疾患は腎硬化症 12.3%であり、続いて不明が 11.0%と、いずれも一貫して増加傾向にある（図 1）[1]。慢性の腎疾患、特に糸球体疾患の確定診断には、腎生検による病理組織学的検査が必須である。しかし、腎生検は観血的・侵襲的検査であるため、禁忌となる症例が存在する。我が国の維持透析患者のうち、腎生検を施行され診断されていた患者は約 5.3%にすぎない[2]。また、生体腎移植レシピエントのうち、原疾患が糸球体腎炎とされている症例に限っても 39.5%は腎生検が未施行である[3]。腎生検の禁忌とされるものは、①片腎、②管理困難な出血傾向、③嚢胞腎、④水腎症、⑤管理困難な全身性合併症（重症高血圧、敗血症）、⑥腎実質内感染症（腎盂腎炎、腎周囲膿瘍、膿腎症）、⑦腎動脈瘤、⑧末期腎（高度の萎縮腎）、⑨体動などで安静の保持困難、である[4]。特に高齢者では、継続が不可欠な抗凝固薬の内服や、認知機能の低下のために安全に腎生検を施行することが困難であり、正確な診断が出来ず、本来積極的な治療が可能な疾患にもかかわらず、結果として十分な治療を受けられず末期慢性腎不全まで進展してしまっている危険性を否定できない症例が存在する。

また、成人の腎疾患は高齢化が進むにつれ、生活習慣病に起因する腎障害が増加し、それらの腎障害が合併することが多いためしばしば鑑別が困難となることがある。特に膜性腎症や腎硬化症、糖尿病性腎症は高齢者において多い疾患であるが、血尿が必発である IgA 腎症や、全身倦怠感や、他の血管炎所見を伴う、ANCA 関連血管炎とは異なり、蛋白尿が主体で、緩徐に尿蛋白が増加する。微小変化型ネフローゼ症候群も高齢者でもピークを持つとされるが、その発症は急激である。

膜性腎症は、中高年に発症するネフローゼ症候群の原因の第 1 位を占め、慢性の経過で発症して持続性蛋白尿からネフローゼ症候群に進展する。腎組織で

は腎糸球体基底膜の外側に沿って、IgG と補体成分 C3 の免疫沈着物が顆粒状に沈着することを特徴とする。それに伴って、ポドサイトの足突起に癒合と消失が、さらに細胞間スリット膜にも形態変化が起こり、大量の蛋白尿が出現する。本症の 30%は発症より 2 年以内に自然寛解するが、残りの症例は持続する蛋白尿を呈し、症例によっては末期腎不全へと進行するため、ステロイドや免疫抑制療法が必要とされる[5-7]。

腎硬化症は動脈硬化病変を背景に生じる腎障害の総称である。肥満、高脂血症、耐糖能障害、喫煙なども疾患の成因に関与し、病理組織学的には巣状糸球体硬化病変を呈する。初期には、蛋白尿は多くはないが、腎不全が進行してくると 1g/gCr 以上の蛋白尿を呈することもある。生活習慣などが背景にあり、治療は基本的に塩分制限や減量などの生活習慣の是正と、降圧薬などの対症的治療である。

糖尿病が背景にある症例においては、長年の糖尿病罹患歴や糖尿病性網膜症を有しネフローゼを発症した場合、臨床診断の感度が 95%と高く、腎生検による組織診断の意義は乏しいとされている[8]。しかし一方で、糖尿病性腎症に膜性腎症など別の糸球体腎炎が合併している症例も少なからずあることは事実であり、①糖尿病網膜症を認めない症例、②尿沈渣で多数の変形赤血球や顆粒円柱などの活動性糸球体疾患を示唆する所見を認める症例、③腎症の時期に合致しない病態（尿蛋白の出現が糖尿病発症に先行する場合や急激な尿蛋白の増加や急激な腎機能の低下など）を認める症例においては腎生検を考慮する必要があるともされている[9]。そして、この判断は腎臓専門医においても容易ではなく、かかりつけ医など腎臓内科を専門としない医師においてはなおさらである。したがって、治療法の異なる腎炎の存在を疑う簡便なバイオマーカーの発見が望まれている。

## 1-2 尿中バイオマーカーとは

健常成人では 1 日に約 150L という大量の原尿が糸球体で濾過されている。この原尿が尿細管で再吸収と分泌を受け、腎盂、尿管を経て膀胱に貯留された後、体外に排泄される。原尿中の水分は 99%が再吸収され、尿中にはタンパク質の分解産物である尿素、塩化ナトリウム、クレアチニン、尿酸、カリウム、カルシウム、マグネシウム、アンモニア、リン酸、硫酸などが含まれている。このよ



うな一般的な小分子量物質以外にも少量のたんぱく質やペプチドなどが尿中に排泄されていることが知られていた。

近年、蛋白質や様々な物質の解析技術の進歩により、健常時ならびに病的状態におけるこのような尿の微量成分の検出が可能となり、様々な疾患の診断ならびに予後と関連する物質の存在が明らかとなってきた。急性腎障害においては近位尿細管にてKim-1 [10]やNGAL [11]などのさまざまな分子の発現の亢進が確認され、我が国発の腎障害進行のバイオマーカーとしてL-FABP [12]の重要性も注目されている。これらの多くは尿細管の障害を反映するものであり、一部は尿中にも排泄されており、尿中バイオマーカーとして研究され、臨床応用されてきている（図2） [13, 14]。しかし、糸球体障害を対象とした場合、臨床的に有用な尿中バイオマーカーは、従来からある総蛋白排泄量やアルブミン排泄量を上回るものはない。総蛋白やアルブミンは糸球体構成細胞固有の分子ではなく、糸球体障害の結果として血中から尿中に排泄されているものを見ているだけである。以上から、糸球体疾患の診断、予後を推測可能な尿中バイオマーカーの開発は今後の発展が期待される分野である。

### 1-3 糸球体上皮細胞(ポドサイト)の特徴

糸球体上皮細胞（ポドサイト）は、腎糸球体の基底膜管腔側に位置している。糸球体を構成する他の細胞と比べ特異な形態をとり、足突起という細胞突起を無数に有し、その形態学的特徴からたこ足細胞とも呼ばれる。高度に分化した細胞であり、増殖能に乏しいなどの生物学的な特性を有している [15]。ポドサイトは、隣り合うポドサイト同士の足突起間でスリット膜により接合していて、このポドサイト・スリット膜が濾過障壁として重要な役割を果たしている。近年、ポドサイトの障害が糸球体疾患の発症や進展に深くかかわっていることが明らかになってきた [16]。

微少変化型ネフローゼ症候群では、光学顕微鏡ではポドサイトの変化は確認されないが、電子顕微鏡レベルで観察すると足突起の平坦化などの変化を認め、ポドサイトの微細形態の変化が、その発症に大きく関わっている。

一方、巣状糸球体硬化症では、ポドサイトが糸球体基底膜から脱落し、露出した基底膜とボウマン囊上皮細胞が癒着をきたし、巣状体糸球体硬化病変を形

成することが知られている[17-19]。すなわち、ポドサイトの相対的な減少は不可逆的な障害となり、同部位の糸球体硬化から、末期腎不全に至ると推測されている（図 3）[20]。したがって、ポドサイトの尿中への脱落を見ることは腎障害進展の尿中バイオマーカーであり、その有用性がすでに報告されている[21]。微小変化型ネフローゼ症候群では、ポドサイトの脱落は少なく予後が比較的良好であり[22]、糖尿病性腎症では蛋白尿を伴う腎障害進行例でポドサイト脱落が多く認められたという報告がある[23]。

しかし、尿中脱落ポドサイトのカウントは時間がかかり、観察者の熟練を要する手技である。そこで、それに代わる客観的な評価マーカーの開発が望まれている。尿沈渣や全尿中のポドサイト特異的たんぱく質の定量、特にポドカリキシンの定量が有用と考えられ、検討が行われている。ポドカリキシンは、ポドサイトの頭頂端に発現する膜貫通型のシアロプロテインで、NHERF2-ezrin と複合体を形成し、アクチン繊維と結合することでポドサイトの足突起とスリット膜の形態維持に重要な役割を担っている[24]。ポドカリキシンは造血幹細胞や血管内皮細胞にも発現していることが報告されているが[25]、血管内皮細胞や造血幹細胞などは尿中へは排泄されておらず、尿沈渣中のポドカリキシン定量はポドサイト脱落を半定量化するために有用であると考えられている。

Kanno らは小児の腎疾患を炎症性の疾患（IgA 腎症、紫斑病性腎炎、ループス腎炎、膜性増殖性糸球体腎炎、ブドウ球菌感染後腎炎）と非炎症性の疾患（膜性腎症、微小変化型ネフローゼ症候群、巣状糸球体硬化症）に分け比較検討し、尿沈渣から測定したポドカリキシン定量値が炎症性疾患と非炎症性疾患ともに正常と比較して高く、さらに炎症性疾患においてポドカリキシン高値は急性の管外性病変、半月体形成の程度との関連が高かったことを報告した[26]。また、成人の IgA 腎症における検討では、全尿中のポドカリキシン排泄量は管外性病変の程度と相関することから、疾患活動度が高い症例で高値であると報告がなされている[27]。

#### 1-4 mtDNA の尿中排泄の意義

ミトコンドリアはすべての真核生物がもつ酸化的リン酸化により生体エネルギー産生をなす細胞内小器官である。ミトコンドリアは独自の環状 2 本鎖 DNA を持ち、細胞とは独立して増殖する。以前よりミトコンドリア機能の異常が糖

尿病の発症や老化の進行と関連することが報告されており[28]、特に mtDNA 変異により発症するミトコンドリア病の患者では、巣状糸球体硬化病変を呈し、そのポドサイトには異常ミトコンドリアが蓄積していることが知られている[29]。また、我々の研究室では家族性巣状糸球体硬化症の患者で腎組織中にミトコンドリアの形態異常と同時に mtDNA 変異の蓄積を確認し報告している[30]。

ミトコンドリア量の調節には sirt1、PGC1 $\alpha$ などを介した合成系と、Bnip3、Foxo3などを介したオートファジー[31]による分解系、さらには Rho-kinase を介した fission、fusion によるミトコンドリアそのものの形態学的な変化がある。ポドサイトは、腎臓において尿細管上皮細胞についてミトコンドリアを多く有する細胞である。ポドサイトにおいては、高血糖がオートファジーを抑制し[32]、一方で Rho-kinase (ROCK1)を介し、ミトコンドリア fission を誘導、その結果としてミトコンドリア量を増加させることによってポドサイトの恒常性維持に働いていると報告されている[33]。

ピューロマイシンアミノヌクレオシド (PAN) 腎症ラットは、PAN 15mg/100g 単回腹腔内投与により可逆的な蛋白尿を呈し、微小変化型ネフローゼ症候群のモデルとして古くから使用される。さらに、蛋白尿が改善する 28 日目から、35 日目、42 日目と PAN 5mg/100g を複数回腹腔内投与することによって不可逆性の蛋白尿を呈し、病理組織上、巣状糸球体硬化症を呈する動物モデルとなる[34, 35]。我々の研究室では過去に、このモデルにおいて、ネフローゼの原因として活性酸素の増加が重要であると報告しており[36]、さらに、同モデルラットのポドサイト中の mtDNA がネフローゼ期に増加し、巣状糸球体硬化症期に減少することを証明し、ポドサイト障害において重要な役割を担っている可能性を報告してきた[34]。

また、尿中には細胞質を伴わない free DNA の存在も確認されており、検討が行われている。移植後の拒絶反応や悪性腫瘍のバイオマーカーとして有用であることが報告されており[37-39]、尿中へ free の状態で mtDNA が排泄されている可能性がある。

以上のことから、脱落ポドサイト中の mtDNA の定量、尿中 free mtDNA の定量が腎障害におけるマーカーとして有用である可能性が十分に考えられる。

## 1-5 メガリンの尿中排泄の意義

メガリンはLRP-2(lipoprotein receptor related protein-2)ともよばれ胆嚢上皮細胞や網膜色素上皮細胞、内耳の内リンパ嚢などに存在し、腎臓では近位尿細管細胞の管腔側表面に高発現している。メガリンは約 600KDa からなる巨大な分子であり、非常に大きな細胞外ドメインと小さな細胞内ドメイン(NPXY ドメイン)で構成されている。4398 アミノ酸からなる細胞外ドメインは3つのタイプの繰り返し配列によって構成されており、1つは36のシステインに富む complement type の繰り返し配列、2つめはエンドソーム区画の中で pH 依存性に放出されるスペーサーリガンドを含む8つの YMTD へと続く16の成長因子の繰り返し配列、3つめは単一の表皮成長因子様の繰り返し配列(EGF-type repeat)に分けられる[40, 41] (図4)。その機能は、キューブリンと同様のエンドサイトーシスレセプター蛋白であり、糸球体から濾過される様々な低分子量蛋白や近位尿細管上皮細胞から尿細管腔に放出される蛋白を再吸収する。メガリンノックアウトマウスやメガリン遺伝子異常の患者はアルブミン尿や低分子量たんぱく尿の増加を認める[42, 43]。メガリンは gp330 とも呼ばれ、膜性腎症のモデルである Heymann 腎炎ラットの対応抗原としても知られていた[44]。メガリンに対する抗体は糸球体基底膜の上皮下に免疫複合体を形成し、膜性腎症を惹起するものである。しかし、当時はヒトポドサイトにメガリンの発現を証明することはできず、その発症機序に関する詳細は不明な部分を残していた。近年、メガリン[45]やキューブリン[46]が、ヒトポドサイトにも発現していることが報告されてきおり、尿細管だけでなくポドサイトにおいても何らかの機能を有している可能性が示唆されている。

尿中のメガリンを測定する研究は、尿細管障害の代表的疾患である Fanconi 症候群の患者尿で初めて報告されており、Fanconi 症候群の一部において、細胞内ドメインを含むメガリンの尿中排泄が低下していたというものであった[47]。さらに、プロテオミクスを用いた研究で1型糖尿病において、微量アルブミンを認める症例ではメガリン、キューブリンの尿中排泄が正常より多かったという報告もなされている[48]。Saito らは尿中メガリンを ELISA 法にて定量する系を開発し、2型糖尿病の腎症早期にアルブミンより先に細胞内ドメインを含む尿中メガリンが高値となり、腎症発症の有用なバイオマーカーとなりうることを報告している[49]。彼らは、尿中メガリンのさらに詳細な検討により、この腎症

発症に有用な尿中メガリンは、細胞内ドメインを含むメガリン（C-メガリン）であると報告している。一方で、細胞外ドメイン単独の領域（A-メガリン）が正常でも多く尿中に排泄されていることも同時に報告している[49]。

糸球体障害における尿中メガリン排泄の意義についての報告はない。糸球体疾患における尿中メガリン測定の意義、疾患活動性や鑑別マーカーとしての有用性を検討する意義がある。

## 2 研究①「尿中脱落ポドサイト、尿中ポドカリキシン、尿中脱落ポドサイト中 mtDNA、尿中 free mtDNA、尿中メガリンの腎疾患における診断・病勢マーカーとしての有用性の検討」

### 2-1 目的

膜性腎症、腎硬化症、糖尿病性腎症は蛋白尿主体の尿異常を呈し、高齢者に多くしばしば鑑別が困難となる。そこで、これらの腎疾患において尿中ポドカリキシン排泄量、尿中脱落ポドサイト数、尿中脱落ポドサイト中 mtDNA 量、尿中 free mtDNA 量、尿中メガリン（C-メガリン、A-メガリン）排泄量を測定し、これらのマーカーが疾患鑑別や糸球体障害の把握に有用なマーカーとなり得るかを検討する。

### 2-2 対象

当院腎臓内科および関連病院で入院または外来加療中で、蛋白尿排泄量が 1g/gCr 以上の腎生検で確定診断した膜性腎症患者 17 例（年齢 63.4 ± 9.8 才、男女比 10 : 7）、腎硬化症 11 例（年齢 55.6 才 ± 19.1 才、男女比 6 : 5）、さらに臨床的に診断された糖尿病性腎症 17 例（年齢 57.8 ± 8.4 才、男女比 16 : 1）を対象とした。なお、これら 3 つの疾患群では、平均年齢、尿蛋白には疾患ごとの有意差はなかった。糖尿病性腎症ではその他の疾患に比して男性が有意に多く、糖尿病性腎症では膜性腎症に比して eGFR が有意に低値であった（表 1）。

### 2-3 方法

#### 2-3-1 サンプル

随時尿を採取し、尿蛋白、尿中脱落ポドサイト数、尿中ポドカリキシン量、尿中脱落ポドサイト中の mtDNA 量、尿中 free mtDNA 量、尿中メガリン、 $\alpha$ 1-ミクログロブリン、 $\beta$ 2-ミクログロブリン、N-アセチルグルコサミニダーゼ (NAG) を測定した。また、腎機能を評価するために、血清クレアチニンなどの測定を行った。本研究を行うにあたって筑波大学倫理委員会の承認（承認番号 184、219）を受け、患者に説明の上、書面による同意を得た。

### 2-3-2 尿中脱落ポドサイト数の測定

尿中の脱落ポドサイト数の測定には、ポドカリキシンの外領域の糖鎖部分に反応するマウスモノクローナル抗体を使用した。随時尿 10ml を 700g×5 分遠心して得た沈渣をサイトスピンで 1000 回転 3 分遠心し、沈渣標本を作った。PBS で 3 回洗浄後、2000 倍希釈した抗ポドカリキシン抗体を滴下し、室温で 2 時間反応させた。PBS で 3 回洗浄後、Alexa 488 抗マウス IgG 抗体で 30 分反応、核染色として 4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride (DAPI) を使用、PBS で 3 回洗浄後に封入剤 (DAKO fluorescent medium) で封入し、蛍光抗体顕微鏡で観察した。DAPI 陽性により細胞核を有する細胞と判断、ポドカリキン陽性の細胞をポドサイトとしてカウントし、尿 10ml あたりのポドサイト数を計測した。標準化を目的に尿中クレアチニン濃度で補正した。

### 2-3-3 尿中ポドカリキシン定量 (ELISA)

患者の随時尿を攪拌し、10ml を凍結保存した。マウスモノクローナル抗ポドカリキシン抗体が固定化されたプレートと HRP で標識された別の抗ポドカリキシン抗体を使用してのサンドイッチ ELISA にて測定した。具体的には、尿 50  $\mu$ l と溶液 A (400 mM TES-NaOH, 40 mM EDTA, 0.4%(v/v) Triton X-100, pH 7.0) 50  $\mu$ l を混和し、室温で 1 時間インキュベートし、100  $\mu$ l の混和物を抗ポドカリキシン抗体が固定されたウェルに滴下、37°C 1 時間反応の後、PBST で 3 回洗浄、その後 HRP で標識された異なる抗ポドカリキシン抗体を各ウェルに 100  $\mu$ l 滴下し、37°C で 1 時間反応、PBST (20  $\mu$ l/well) にて 3 回洗浄、次に TMB 溶液 (TMB One-Step Substrate System; DAKO) 100  $\mu$ l/well を加え、HRP との酵素反応を媒介、25°C 30 分反応させ、すぐに 0.3N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液を 100  $\mu$ l ずつ各ウェルに添加し反応停止させた。吸光度計を用い、比色分析吸光度参考波長 (630nm) の吸光度から主波長 (450nm) での吸光度を測定し、検量線からポドカリキシンの量を算出した。対照としてリコンビナント ポドカリキシン細胞内分画を使用した。この方法により得られた値は 5.2 - 167ng/ml の間に入り、検出限界は 3.6ng/ml であった。

正常コントロールとして 66 人の健常人の検体を用いた。測定値を BOX-COX 変換にて正規化した後、95% 区間 (平均 +1.96SD) として基準範囲を求め、正常上限は 171  $\mu$ g/gCr とした。

#### 2-3-4 尿中脱落ポドサイト中の mtDNA 定量 (qPCR)

随時尿 10ml を 700g×5 分遠心して得た尿沈査から、先のマウスモノクローナル抗ポドカリキシン抗体を用い、磁気ビーズと結合した抗マウス IgG 抗体を反応させ、磁石によりポドサイトを分離・生成した。得られたポドサイトから、DNeasy Tissue Kit(QIAGEN sciences, MD, USA)を使用して DNA を抽出。TaqMan-MGB® probes (Applied Biosystems, Inc.)を用い ABI7500TaqManPCR マシンにて real-time PCR を施行。18SrRNA で mtDNA 量を  $\Delta\Delta CT$  法により半定量した。使用したプライマーとプローブは表 2 に示すとおりである。

#### 2-3-5 尿中 free mtDNA 量測定 (qPCR)

尿 10ml を 700g×5 分遠心して得た上清 180  $\mu$ l を用い、DNeasy Tissue Kit(QIAGEN sciences, MD, USA)を使用して DNA を抽出。TaqMan-MGB® probes (Applied Biosystems, Inc.)を用い ABI7500TaqManPCR マシンにて real-time PCR を施行。尿上清 mtDNA 量は、正常患者血から抽出した定量用 DNA サンプルを用い希釈系を作り検量線を作成し、 $10^7$  希釈濃度の定量物質の mtDNA 数を 1 とし、sample の DNA 量を  $\Delta\Delta CT$  法により半定量した。使用したプライマーとプローブは表 2 に示すとおりである。

#### 2-3-6 尿中メガリン定量 (ELISA)

メガリンの測定は 2 つの異なる抗メガリン・モノクローナル抗体を用いた。一つはアミノ末端に対する LBD 1 抗体 (A-メガリン抗体) で、細胞外ドメインを認識する。もうひとつはカルボキシル末端に対する抗 CT 抗体 (C-メガリン抗体) で細胞内ドメインを認識する。抗メガリンモノクローナル抗体を ELISA プレートに固定化し、90  $\mu$ l の尿と 10  $\mu$ l の 10%トリトン X 溶液を混合し、C-メガリン測定では 1 分間室温でインキュベート、A-メガリン測定では 3 時間 50℃でインキュベートし、ELISA プレート内でアルカリフォスファターゼ標識した抗 A-メガリン・モノクローナル抗体もしくは抗 C-メガリン・モノクローナル抗体と反応した。化学発光免疫測定検出系を使用した。尿中 A-メガリンと C-メガリンの正常上限のカットオフ値はそれぞれ、211.3pmol/gCr と 523.5fmol/gCr であった。



### 2-3-7 その他のマーカー測定

尿クレアチニン濃度（酵素法 CRE-S）、尿蛋白（ピロガロールレット法 protein assay rapid kit wako）、 $\alpha$ 1-ミクログロブリン（ラテックス法  $\alpha$ Mi-ラテックス「生研」）、 $\beta$ 2-ミクログロブリン（ラテックス法 BMG-ラテックス X1「生研」）、NAG（合成基質 MPT 法 NassayLNAG ニットーボー）を自動分析装置（HITACHI7170S）で測定した。血清クレアチニンは酵素法定法で測定した。血清クレアチニン検査の結果を基に eGFR を算出した。eGFR の算出には、日本人の eGFR 計算式 ( $\text{eGFR}(\text{ml}/\text{min}/1.73\text{m}^2) = 194 \times \text{Cr}^{-1.094} \times \text{age}^{-0.287}$ （女性は  $\times 0.739$ ）を用いた[50]

### 2-3-8 統計解析方法

2 群間の比較では 2 標本 t 検定を使用した。相関解析の検討では Pearson の単純相関検定を用いた。P 値  $< 0.05$  を統計学的有意と判断した。

## 2-4 結果

### 2-4-1 尿中脱落ポドサイト数と尿中ポドカリキシン排泄量の検討

各疾患群における尿中脱落ポドサイト数の比較では膜性腎症では  $1.51 \pm 3.0 \times 10^3/\text{gCr}$  であり、腎硬化症で  $0.23 \pm 0.4 \times 10^3/\text{gCr}$ 、糖尿病性腎症で  $1.23 \pm 1.65 \times 10^3/\text{gCr}$  であった。疾患毎に有意差はなかったが、膜性腎症と糖尿病性腎症でポドサイト脱落を多く認める症例があった（図 5）。

疾患群ごとに尿蛋白と尿中脱落ポドサイトの関係をみたところ、膜性腎症において、尿中脱落ポドサイト数と尿蛋白量の間に正の相関関係 ( $r=0.76$ ,  $P<0.01$ ) を認めた（図 6）。

各疾患群での尿中ポドカリキシン排泄量の比較では膜性腎症では  $342.5 \pm 369.8 \mu\text{g}/\text{gCr}$  であり、腎硬化症で  $48.8 \pm 37.5 \mu\text{g}/\text{gCr}$ 、糖尿病性腎症  $80.6 \pm 70.5 \mu\text{g}/\text{gCr}$  と比較して有意に高値であった。膜性腎症患者 17 例中、正常上限 ( $171 \mu\text{g}/\text{gCr}$ ) を越えたのは 10 例 (58.8%)、これに対し、腎硬化症 11 例中 0 例 (0%)、糖尿病性腎症 17 例中 2 例 (11.8%) で、膜性腎症での高値例が明らかに多かった（図 7）。

疾患群毎に尿中ポドカリキシン排泄量と尿蛋白量の関係を調べたところ、膜性腎症においてのみ有意な正の相関 ( $r=0.61$ ,  $P<0.01$ ) が認められた。その他の

疾患群では尿ポドカリキシン排泄量と尿蛋白量に関連性は見いだされなかった（図 8）。

尿中脱落ポドサイトと尿中ポドカリキシン排泄量の関係を調べたところ膜性腎症において尿中脱落ポドサイト数と尿中ポドカリキシン排泄量の間には有意な正の相関関係 ( $r=0.85$ ,  $P<0.001$ ) を認めた。そのほかの疾患群では尿中脱落ポドサイト数と尿中ポドカリキシン排泄量の間には関連性はみられなかった（図 9）。

#### 2-4-2 尿中脱落ポドサイト中の mtDNA 量の検討

各疾患群の尿中脱落ポドサイト中の mtDNA 量を mtDNA/18SrRNA 比で比較したところ、膜性腎症は  $0.98 \pm 0.44$  であり、腎硬化症  $1.19 \pm 1.14$ 、糖尿病性腎症  $0.60 \pm 0.31$  と、糖尿病性腎症では膜性腎症と比較して有意に mtDNA 量が少なかった（図 10）。各疾患別に脱落ポドサイト数と尿中脱落ポドサイト中の mtDNA 量を比較検討したが統計学的に有意な関連性は見られなかったが膜性腎症と糖尿病性腎症において、mtDNA 量が減少している症例で脱落ポドサイトを多く認めた。（図 11）。

各疾患別に尿中ポドカリキシン排泄量と、尿中脱落ポドサイト中の mtDNA 量を比較検討したところ、糖尿病性腎症は他疾患と比較してポドサイト中の mtDNA 量は少なかったが、尿中ポドカリキシン排泄量との間に正の相関関係 ( $r=0.79$ ,  $P<0.01$ ) がみられた（図 12）。

#### 2-4-3 尿中 free mtDNA 量の検討

疾患群における尿上清中の free mtDNA 量は、膜性腎症では  $6.64 \pm 6.67 \times 10^9$  / gCr であり、腎硬化症で  $2.25 \pm 2.46 \times 10^9$  / gCr、糖尿病性腎症  $2.26 \pm 1.19 \times 10^9$  / gCr と、膜性腎症において他の 2 群より有意に多かった（図 13）。

疾患群毎の尿中 free mtDNA 量と尿蛋白の関連性を確認したが、どの疾患群でも尿中 free mtDNA 量と尿蛋白量に関連性は見いだされなかった（図 14）。

また、尿中 free mtDNA 量と尿中ポドカリキシン排泄量の関係を疾患ごとにみたが、どの疾患群においても関連性は見られなかった（図 15）。

#### 2-4-4 膜性腎症における尿蛋白、eGFR と各マーカーの関係

ここまでの検討で膜性腎症において他の疾患と比較し有意な差がみられていたため、膜性腎症での尿蛋白量や腎機能と、尿細管障害マーカーを含め今回測定した各種検査項目との関連性を検討した。

膜性腎症において尿蛋白量と、各マーカーとの相関を単相関分析で検討したところ、尿中ポドカリキシン排泄量、尿中脱落ポドサイト数と、それぞれ有意な相関を認めた。さらに、尿細管障害マーカーである C-メガリンと NAG とも有意な相関を認めた (表 3)。

腎機能 (eGFR) と各マーカーとの相関を単相関分析で検討したところ、A-メガリンと正の相関 ( $r = 0.64$ ) を認め、NAG、 $\alpha 1$ -ミクログロブリン、 $\beta 2$ -ミクログロブリンと負の相関関係 ( $r = -0.49$ ,  $P < 0.05$ ) ( $r = -0.59$ ,  $P < 0.05$ ) ( $r = -0.54$ ,  $P < 0.05$ ) を認めた (表 3)。

#### 2-5 考察

##### 2-5-1 腎疾患におけるポドサイト関連検査の鑑別マーカー、疾患活動性マーカーとしての有用性の検討

尿蛋白 1g/gCr 以上の膜性腎症、腎硬化症、糖尿病性腎症の 3 つの疾患群を比較したところ、尿中ポドサイト脱落は各疾患群間において統計学的に有意な差は認められなかった。しかし、膜性腎症や糖尿病性腎症の一部にポドサイト脱落が多い症例が認められ (図 5)、膜性腎症では尿蛋白量と脱落ポドサイト数に相関を認め (図 6)、糖尿病性腎症においても尿蛋白が 4g/gCr 以上の症例のみにおいて脱落ポドサイト数が多い症例を認めた (図 6)。このことから、脱落ポドサイト数が疾患活動性のマーカー、予後マーカーとして有用である可能性が考えられた。腎機能予後など経過を観察したさらなる検討が必要であると思われる。

尿中ポドカリキシン排泄量は、3 つの疾患群を比較したところ、膜性腎症において高値であった。膜性腎症においては、尿中ポドカリキシン排泄量と尿中脱落ポドサイト数の間には有意な正の相関関係を認めていたため (図 9)、尿中脱落ポドサイトの定量化を目的とした尿中ポドカリキシンの定量は、膜性腎症においては有用性がある可能性が推測された。しかし、詳細に検討すると、糖尿病性腎症ではこの相関は認めず、さらに膜性腎症においても 2 例の尿中ポドカ

リキシン排泄量高値、尿中脱落ポドサイト数高値の症例の影響が大きく(図 9)、症例数を増やしたさらなる検討を行う必要性があることが明白であった。

また、近年の報告では、尿中には微細粒子構造物 (micro-particle) が排泄されており、これはエクソソーム小胞(exosome vesicle)や膜小胞 (membrane vesicle)、細胞壊死組織片 (debris) などさまざまな構造物を含んでいる[51]。尿中ポドカリキシン排泄は沈渣中のポドサイトの反映だけでなく、ポドカリキシン陽性顆粒が微細粒子の形状で排泄されており、これはエクソソーム小胞ではないことが報告されている[52]。今回の検討でも、膜性腎症においては尿中脱落ポドサイト数が少ないにも関わらず、大量に尿中ポドカリキシンの排泄を認める症例が多数あり(図 9)、尿中ポドサイト脱落以外の影響が尿中ポドカリキシン排泄に大きく影響していると判断した。そこで膜性腎症や他の糸球体疾患において、尿中脱落ポドサイトの影響を除去した尿上清を用い、ポドカリキシンの定量を行い、鑑別マーカーや疾患活動性マーカーとしての有用性を検討する必要があると考えられた。

## 2-5-2 尿中 mtDNA 測定の意義

過去に我々は、PAN 腎症ラットにおいて、巣状糸球体硬化症期にはポドサイト中の mtDNA が減少しており、ポドサイトの脱落、巣状糸球体硬化病変の形成にはミトコンドリア機能低下が関与している可能性があることを報告している[34]。今回の検討では膜性腎症と糖尿病性腎症では、尿中に脱落ポドサイトを認めるが、その脱落ポドサイト中の mtDNA 量は糖尿病性腎症においてのみ有意に低下していた。このことは、PAN 腎症での腎障害進行におけるポドサイトのミトコンドリア変化と類似しており、ポドサイト中の mtDNA 量が少ないと脱落ポドサイトが増加し、係蹄の癒着から巣状糸球体硬化病変を形成するという機序をみている可能性が推測された。さらに、図 11 では統計学的有意ではなかったものの、膜性腎症においても脱落ポドサイトが多い症例ではポドサイト中の mtDNA 量が少ない傾向があり、ポドサイト脱落にミトコンドリア機能低下が関与している可能性が考えられた。

一方で尿中脱落ポドサイト中の mtDNA 量の定量には、尿中脱落ポドサイトの精製回収のために、抗ポドカリキン抗体を用いたビーズ法を行っている。この脱落ポドサイト精製においては、ポドカリキン陽性微細粒子構造物や、同構造物を含んだ円柱成分、さらには細胞壊死組織片(尿細管細胞も含め)などのコ

ンタミネーションが多く起こるという問題がある。また、膜性腎症においては、尿中 free mtDNA 量が増加していたことから、この尿中 free mtDNA が脱落ポドサイトの回収時にコンタミネーションしている危険性が推測され、このコンタミネーションは 18SrRNA を対照としたポドサイト中 mtDNA 量を過大評価している危険性が危惧された。尿中 free mtDNA 排泄が多い膜性腎症では、このコンタミネーションによりポドサイト中 mtDNA/18SrRNA 比が過大評価されていると、膜性腎症も糖尿病性腎症と同様に脱落ポドサイト中 mtDNA は減少している可能性があり、ポドサイト脱落と mtDNA 量減少に何らかの因果関連が存在する可能性が推測される。今後さらなる検討が必要であると考えられた。

膜性腎症においては、free mtDNA 量が腎硬化症や糖尿病性腎症と比較して多く検出された。この free mtDNA は、細胞壊死組織片などをみているのか、膜小胞やエクソソーム小胞などの排泄小胞内に局在していたものを見ているのかは、今回は明らかにできていない。またミトコンドリアは真核細胞に存在しており、腎臓においては近位尿細管上皮細胞にもっとも多く存在するため[53]、今回検出された free mtDNA が、ポドサイトを起源としているのか尿細管上皮細胞を起源としているのかも現時点では断定できない。今回の検討ではポドサイト障害の代表的疾患である膜性腎症で比較的蛋白尿の多い症例で尿中 free mtDNA が増加しており、一方で他の尿細管障害マーカー（NAG など）とは有意な関連を示さなかったことより、この free mtDNA が尿細管上皮細胞のみではなく、ポドサイト由来であり、ポドサイト障害の結果、排泄された可能性も十分に考えられる。

尿中 free mtDNA の測定にも多くの問題を抱えている。今回の real time PCR 法では環状 2 本鎖構造をとる mtDNA のうち 100bs 程度を PCR にて増幅し定量を行っているため、完全長の mtDNA を見ているとは限らない。尿中プロテオミクス研究においては、尿中微細小胞分画にミトコンドリア関連蛋白が多く検出され報告されており[51]、この微細小胞内に mtDNA の破壊断片が存在している可能性も推測され、膜性腎症における尿中ポドカリキン陽性膜小胞の排泄が増加していた結果と合わせると、尿中 free mtDNA の膜性腎症における排泄増加は同様の変化を見ている可能性も推測された。しかし、本研究においては尿ポドカリキン排泄量と尿 free mtDNA 量の間には有意な関係が認められなかったことから、今後さらなる検討が必要である。

### 2-5-3 糸球体疾患における随時尿中 A-メガリンの腎機能推算マーカーとしての可能性

本研究において、膜性腎症において随時尿中 A-メガリン排泄量と推算糸球体濾過量 (eGFR) が正の相関関係を認めた。斎藤らは、通常状態でメガリンの細胞外ドメイン (A-メガリン) が単独で尿中に排泄されていることを報告している[49]。今回、この A-メガリン排泄量が推算糸球体濾過量 (eGFR) と正の相関関係を認めたことは、尿中 A-メガリン排泄は尿細管細胞から定常状態で安定的に排泄されており、その排泄量は尿細管細胞数すなわちネフロン数を反映するのではないかという仮説も推測され、A-メガリン排泄量が腎機能推算マーカーとなり得る可能性が示唆された。

### 2-6 結語

尿中ポドカリキシン排泄量は膜性腎症において、1 g/gCr 以上の蛋白尿を有する腎硬化症や糖尿病性腎症と比較して有意に高く、尿中ポドサイト脱落以外の疾患活動性を表していることが示唆された。

尿中脱落ポドサイトの mtDNA 量は糖尿病性腎症において有意に低下しており、ポドサイト脱落にミトコンドリア機能低下が関与している可能性が推測された。

尿中 free mtDNA 量は膜性腎症において腎硬化症、糖尿病性腎症と比較して多く検出され、ポドサイト障害と関連している可能性が考えられた。

膜性腎症において随時尿中 A-メガリン排泄量が推算糸球体濾過量と正の相関関係を認め、腎機能推算マーカーとなり得る可能性が示唆された。

### 3 研究②「膜性腎症における尿上清ポドカリキシンと尿中脱落ポドサイトの病勢・鑑別マーカーとしての有用性とポドカリキシン排泄のメカニズムの検討」

#### 3-1 目的

研究①で膜性腎症においては、尿中脱落ポドサイト数が少ないにも関わらず大量に尿中ポドカリキシンの排泄を認める症例を多数認めたことから、脱落ポドサイトを除去した尿上清中ポドカリキシン排泄量を測定し、膜性腎症の病勢毎の比較、ネフローゼ症候群を来すその他の糸球体疾患（ステロイド反応性ネフローゼ症候群、巣状糸球体硬化症）と比較検討し、その測定意義と臨床的有用性を検討することとした。

さらに、電子顕微鏡所見や超遠心の結果も踏まえ、膜性腎症のポドサイトにおける尿中ポドカリキシン排泄のメカニズムを検討することとした。

#### 3-2 対象

##### 3-2-1 膜性腎症の病勢毎の尿上清中のポドカリキシン排泄量の比較検討

当院腎臓内科および関連病院で入院または外来加療中の、腎生検で確定診断した膜性腎症患者 71 例を対象とした。ネフローゼレベルの蛋白尿 ( $UP \geq 3.5\text{g/gCr}$ ) を呈する患者 34 例（年齢  $65.2 \pm 12.9$  歳、男女比 19:15）、非ネフローゼレベルの蛋白尿 ( $0.3\text{g/gCr} \leq UP < 3.5\text{g/gCr}$ ) を呈する患者 18 例（年齢  $63.7 \pm 11.4$  歳、男女比 12:6）、完全寛解 ( $UP < 0.3\text{g/gCr}$ ) の患者 19 例（年齢  $62.7 \pm 11.7$  歳、男女比 13:6）を比較検討した（表 4）。健常人（ボランティア）66 例をコントロールとした。

##### 3-2-2 膜性腎症と成人ネフローゼ症候群の比較検討

ネフローゼ症候群において、尿上清中ポドカリキシン排泄量が膜性腎症の鑑別診断マーカーとして有用かどうかを検討するため、ネフローゼ症候群を呈し治療開始前の 31 例、膜性腎症 18 例（年齢  $65.5 \pm 15.0$  歳、男女比 12:6）、ステロイド反応性ネフローゼ症候群（微小変化群 6 例を含む）8 例（年齢  $49.8 \pm 26.6$

歳、男女比 4:4)、巣状糸球体硬化症 5 例 (年齢  $47.0 \pm 26.6$  歳、男女比 3:2) を対象とした。健常人 (ボランティア) 66 例をコントロールとした。患者背景では、膜性腎症の年齢が正常コントロールと比較して有意に高値であった (表 5)。

本研究を行うにあたって筑波大学倫理委員会の承認 (承認番号 184、219) を受け、患者に説明の上、書面による同意を得た。

### 3-3 方法

#### 3-3-1 サンプル

随時尿を採取し、尿蛋白、尿中脱落ポドサイト数、尿中ポドカリキシン量、 $\alpha$ 1-ミクログロブリン、 $\beta$ 2-ミクログロブリン、NAG を測定した。また、ネフローゼの活動性や腎機能を評価するために、血清クレアチニン、アルブミン、コレステロールなどの測定を行った。

#### 3-3-2 尿上清中ポドカリキシン (sup-PCX) 定量 (ELISA)

脱落ポドサイトの影響を除去するため、尿の上清中のポドカリキシン測定 (sup-PCX) を行った。患者の随時尿をコップに採取攪拌し、10ml を  $700g \times 5$  分遠心し測定まで凍結保存した。室温にて解凍後研究①と同様の ELISA 法にてポドカリキシン定量した。

健常成人 66 人の尿上清中ポドカリキシン測定値を BOX-COX 変換にて正規化した後、95%区間 (平均  $+1.96SD$ ) として基準範囲を求め、正常上限は  $158.3 \mu g/gCr$  とした。

#### 3-3-3 尿中脱落ポドサイト数の測定

尿中脱落ポドサイト数の測定は研究①と同様の手法で行った。

#### 3-3-4 超遠心上清中ポドカリキシン (ultra-sup-PCX) 定量

ポドサイトを含む沈渣成分を除去するため、 $700g \times 5$  分の遠心で得られた尿上清を、さらに微細構造物を除去する目的で  $4^{\circ}C$ 、 $200,000g \times 110$  分で超遠心した。得られた  $50 \mu l$  の超遠心上清は可溶性蛋白分画として、同様に ELISA 法でポドカリキシンを定量した。



### 3-3-5 ポドサイトの微絨毛変化の評価（電子顕微鏡的検討）

透過型電子顕微鏡検査で糸球体を観察し得た膜性腎症患者（30 症例）について、観察者 2 人によって、透過型電子顕微鏡写真 3,000 倍でのポドサイト微絨毛変化をその程度から図 16 のようにスコア化し平均を取り、尿上清中ポドカリキシン値との関係を検討した。

### 3-3-6 統計解析方法

2 群間の比較では 2 標本 t 検定を使用した。相関解析の検討では Pearson の単純相関検定を用いた。P 値<0.05 を統計学的有意と判断した。

## 3-4 結果

### 3-4-1 膜性腎症患者における疾患活動度と尿上清中ポドカリキシン排泄量の検討

膜性腎症の病勢毎の尿上清中ポドカリキシン排泄量の比較検討（表 2）において、ネフローゼ群、非ネフローゼ群では、完全寛解群および正常コントロール群と比較して血清クレアチニン値が高値であり、同様に eGFR は低値であった。

尿上清中ポドカリキシン排泄量はネフローゼ群において  $362.6 \pm 319.3 \mu\text{g/gCr}$  で、非ネフローゼ群の  $113.4 \pm 85.6 \mu\text{g/gCr}$  や完全寛解群での  $88.8 \pm 59.5 \mu\text{g/gCr}$ 、正常コントロール群の  $88.7 \pm 35.5 \mu\text{g/gCr}$  と比較して有意に高値であった（表 4、図 17）。

尿上清中ポドカリキシン排泄量と腎機能(eGFR)の間には有意な関連は見られなかった(図 18)。また、電子顕微鏡で評価した膜性腎症の病期分類(Ehrenreich &Churg の分類)と、尿上清中ポドカリキシン排泄量には有意な相関関係は見られなかった(図 19)。さらに尿上清中ポドカリキシン排泄量と尿中脱落ポドサイト数の間にも有意な関連性は認められなかった(図 20)。

### 3-4-2 ネフローゼ症候群における鑑別診断マーカーとしての尿上清中ポドカリキシン排泄量の検討

尿上清中ポドカリキシン排泄量について、ネフローゼ症候群を呈する治療開始前の 3 疾患について比較すると、膜性腎症で  $347.5 \pm 379.1 \mu\text{g/gCr}$  は、ステロイド反応性ネフローゼ症候群(微小変化型ネフローゼ症候群:微小変化群)

56.8 ± 61.4 μg/gCr、巣状糸球体硬化症 88.2 ± 39.9 μg/gCr と比較して有意に尿上清中ポドカリキシン排泄量が高値であった(表 5、図 21)。

膜性腎症、ステロイド反応性ネフローゼ症候群(微小変化群)、巣状糸球体硬化症での尿中脱落ポドサイト数は、疾患群における陽性の割合で比較すると、巣状糸球体硬化症で脱落ポドサイト数が膜性腎症、ステロイド反応性ネフローゼ症候群(微小変化群)と比較して多かった(図 22)。

### 3-4-3 膜性腎症における尿上清中ポドカリキシン排泄機構の検討

膜性腎症患者 5 例の尿上清をさらに超遠心し、その超遠心上清を作成しポドカリキシンを測定 (ultra-sup-PCX) した。超遠心の上清中にはポドカリキシンは検出されなかった(表 6)。

尿上清中ポドカリキシン排泄は、可溶性ではなく微細構造の可能性が高いことから、その排泄機序を検討するために膜性腎症の電子顕微鏡写真からポドサイトの形態学的変化を確認、評価した。膜性腎症において、尿上清中ポドカリキシン排泄量と電顕におけるポドサイトの微絨毛変化の程度の間には正の相関関係( $r = 0.432$ ,  $P < 0.05$ )が認められた(図 23)。

## 3-5 考察

### 3-5-1 糸球体疾患における尿脱落ポドサイト数と尿上清中ポドカリキシン排泄量の疾患活動性マーカー、鑑別マーカーとしての有用性について

膜性腎症では糖尿病性腎症や腎硬化症と比較して、尿中脱落ポドサイト数とは関連せずに尿中に大量のポドカリキシン排泄を認めたことから、臨床においてネフローゼ症候群を呈し鑑別診断として問題となるステロイド感受性ネフローゼ症候群(微小変化型ネフローゼ症候群)、原発性巣状糸球体硬化症と比較し、尿上清中ポドカリキシン排泄量が膜性腎症の鑑別診断マーカーとなるか検討した。

鑑別診断マーカーとしての検討の前に、膜性腎症 71 例を、膜性腎症の疾患活動性である尿蛋白排泄量で群分けし各蛋白尿群を比較検討した。すると、やや腎機能に差はあるものの(表 4)、ネフローゼ症候群を呈する症例群において有意に尿上清中ポドカリキシン排泄量が多く(図 17)、ネフローゼ期の膜性腎症でポドサイトから尿中にポドカリキシンが大量に放出されていることが明らか

となった。このことから、尿上清中ポドカリキシン排泄量は膜性腎症の疾患活動性マーカーとして有用であることが明らかとなった。

ネフローゼ症候群を呈する膜性腎症、ステロイド感受性ネフローゼ症候群、原発性巣状糸球体硬化症の3疾患群で、治療介入前の31例を対象（表5）に比較検討したところ、膜性腎症はほかの2疾患と比較して有意に尿上清中ポドカリキシン排泄量が高値であった（図21）。このことから、尿上清中ポドカリキシン排泄量測定は、ネフローゼを呈する膜性腎症を、同様のネフローゼを呈するステロイド感受性ネフローゼ症候群（微小変化型ネフローゼ症候群）および巣状糸球体硬化症から鑑別するマーカーになる可能性が十分にあると考えられた。

一方、脱落ポドサイト数の検討では、治療前のネフローゼ症候群3疾患の比較検討では、巣状糸球体硬化症群で有意に脱落ポドサイト数が多く（図22）、これは過去の報告[54]と同様であり、鑑別マーカーとしての有用性も期待できる結果である。今回の検討では、尿中脱落ポドサイト数の診断マーカーとしての詳細な検討は行っていないが、今後も症例を重ね、その有用性を検討する必要があると思われる。

### 3-5-2 膜性腎症における尿上清ポドカリキシン排泄のメカニズムについて

膜性腎症での尿上清中ポドカリキシン高値は、先行知見のポドカリキシン陽性微細粒子構造物なのか[52]、それとも可溶性蛋白としてのポドカリキシンの排泄なのかを検討した。微細粒子構造物が沈殿する超遠心を施行し、その超遠心上清ポドカリキシン濃度を測定したところ、膜性腎症5例において、超遠心上清中ポドカリキシン濃度は全例検出感度以下であった（表6）。このことから、尿上清中ポドカリキシン高値は、可溶性蛋白として尿中に放出されているのではなく、ポドカリキシン陽性微細粒子構造として尿中にポドサイトから排泄されていることが示された。Haraらは、ポドカリキシン陽性微細粒子構造物はポドサイトの登頂端からポドサイトの細胞膜そのものが膜小胞の形状で排泄されていると推測しており、このポドカリキシン陽性膜小胞は尿中において100nm程度の膜小胞として存在し、糸球体疾患において増加していると報告している[55]。我々の結果から、膜性腎症での尿上清中ポドカリキシン排泄増加は可溶性蛋白ではなく、そのすべてが粒子として排泄されていることが証明された。尿上清中ポドカリキシン排泄機序を検討するために、膜性腎症の電子顕微鏡所見

からポドサイトの形態学的変化を確認、評価した。微絨毛変化の程度が増加するにつれ、尿上清ポドカリキシンが高値となっていた。このことから、膜性腎症においては、ポドサイトの微絨毛変化が強くなり、そこからポドカリキシン陽性の膜小胞が排泄されると推測された。

卵巣癌培養細胞において、ポドカリキシンを過剰発現させると微絨毛変化が増加すると報告されている[56]。さらに、腸管刷子縁膜においてはアクチン骨格において myosin1-a の存在下に微絨毛自体が膜小胞を形成し排泄され、この排泄は ATP 依存的であることが同時に報告されている[57]。しかし、腎疾患におけるポドサイトの微絨毛変化の形成、ポドカリキシン陽性膜小胞排泄の詳細な機序はわかっていない。

膜性腎症の発症には、抗ホスホリパーゼ A2 受容体抗体が関係していることが報告されている[58]。この抗体を含む免疫複合体が基底膜上皮で形成され、補体の活性化を介し、ポドサイトが障害を受け膜性腎症が発症していると推測されている[7]。今回の研究において、その他のネフローゼ疾患と比較し膜性腎症での尿上清中ポドカリキシン排泄が多いことから、我々は、ポドサイトからのポドカリキシン陽性微細粒子構造物の排泄の機序として、この免疫複合体、補体活性が関与していると推測している。このことは、膜性腎症の発症機序とも密接に関与していることが考えられ、今後さらなる検討が疾患発症、進展機序を明らかにするうえでも重要である。

また、最近の報告では、培養ポドサイトや培養血管内皮細胞から微細小胞が排泄されるメカニズムとして、Rho-kinase が関与していることが報告されており、一方で Rho-kinase はミトコンドリア fission と呼ばれるミトコンドリアの断片化や合成系 (biogenesis) にも大きく関与していることも報告されている[33]。これらの事実と研究①の結果から、膜性腎症における尿中ポドカリキシン陽性膜小胞の排泄増加と、膜性腎症尿上清中の free mtDNA 量が増加していたことには、なんらかの因果関係がある可能性も示唆される。本研究においては尿ポドカリキシン排泄量と尿 free mtDNA 量の間には有意な関係が認められなかったことから、今後さらなる検討が必要である。

### 3-6 結語

尿上清中ポドカリキシン排泄量は、治療前のネフローゼ症候群の中では、膜性腎症でのみ有意に高く、尿蛋白量と相関していたことから、膜性腎症の疾患活動性マーカーであり、さらにネフローゼ疾患における膜性腎症の鑑別に有用な診断マーカーであった。

また、膜性腎症における尿上清中ポドカリキシン排泄量の増加は、ポドサイトの微絨毛性変化、微細粒子構造物排泄の増加であり、膜性腎症におけるポドサイト障害のメカニズムを解明する手助けになると考えられた。

#### 4 今後の課題

尿へのポドカリキシン陽性膜小胞の排泄の機序、ミトコンドリア機能との関連を明らかにするために、in vitro での基礎研究によるさらなる検討が重要であると考えられた。

## 5 謝辞

このような研究の機会を与えていただき、ご指導賜りました筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻腎臓病態医学分野教授 山縣邦弘先生に感謝いたします。また、本研究の遂行にあたり終始ご指導ご鞭撻を賜りました、筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻腎臓病態医学分野講師 萩原正大先生には心より感謝申し上げます。また腎臓内科医学部分野研究室の桜井秀子氏、亀甲李恵氏をはじめとする皆様には多くのご指導、ご助言、実験補助していただき、厚くお礼申し上げます。

## 6 参考文献

1. 日本透析医学会統計調査委員会, わが国の慢性透析療法の現況 (2012 年 12 月 31 日現在). 透析会誌, 2014. **47**.
2. 日本透析学会, 図説 わが国の慢性透析療法の現況. 2001.
3. 高原史郎, et al., 腎移植臨床登録集計報告(2009)-1 2008 年実施症例の集計報告(解説). 移植, 2009. **44**(3): p. 250-255.
4. 日本腎臓学会編, エビデンスに基づく CKD 診療ガイドライン 2009. 2009.
5. Shiiki, H., et al., *Prognosis and risk factors for idiopathic membranous nephropathy with nephrotic syndrome in Japan*. Kidney Int, 2004. **65**(4): p. 1400-7.
6. Polanco, N., et al., *Spontaneous remission of nephrotic syndrome in idiopathic membranous nephropathy*. J Am Soc Nephrol, 2010. **21**(4): p. 697-704.
7. Ponticelli, C. and R.J. Glassock, *Glomerular diseases: membranous nephropathy--a modern view*. Clin J Am Soc Nephrol, 2014. **9**(3): p. 609-16.
8. Biesenbach, G., et al., *Clinical versus histological diagnosis of diabetic nephropathy--is renal biopsy required in type 2 diabetic patients with renal disease?* QJM, 2011. **104**(9): p. 771-4.
9. Suzuki, D., et al., *Evaluation of renal biopsy samples of patients with diabetic nephropathy*. Intern Med, 2001. **40**(11): p. 1077-84.
10. Ichimura, T., et al., *Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury*. J Biol Chem, 1998. **273**(7): p. 4135-42.
11. Mishra, J., et al., *Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(10): p. 2534-43.
12. Yokoyama, T., et al., *Urinary excretion of liver type fatty acid binding protein accurately reflects the degree of tubulointerstitial damage*. Am J Pathol, 2009. **174**(6): p. 2096-106.
13. 井上, 紘., et al., **【Critical care nephrology】** 急性腎障害における尿中バイオマーカーの現状. 腎と透析, 2011. **70**(3): p. 339-341.
14. Bonventre, J.V., et al., *Next-generation biomarkers for detecting kidney toxicity*. Nat Biotechnol, 2010. **28**(5): p. 436-40.
15. Asanuma, K. and P. Mundel, *The role of podocytes in glomerular pathobiology*. Clin Exp Nephrol, 2003. **7**(4): p. 255-9.



16. Mundel, P. and S.J. Shankland, *Podocyte biology and response to injury*. J Am Soc Nephrol, 2002. **13**(12): p. 3005-15.
17. Reiser, J., et al., *Novel concepts in understanding and management of glomerular proteinuria*. Nephrol Dial Transplant, 2002. **17**(6): p. 951-5.
18. Kriz, W., N. Gretz, and K.V. Lemley, *Progression of glomerular diseases: is the podocyte the culprit?* Kidney international, 1998. **54**(3): p. 687-97.
19. Kriz, W., *Podocyte is the major culprit accounting for the progression of chronic renal disease*. Microsc Res Tech, 2002. **57**(4): p. 189-95.
20. Wiggins, R.C., *The spectrum of podocytopathies: a unifying view of glomerular diseases*. Kidney Int, 2007. **71**(12): p. 1205-14.
21. Camici, M., *Urinary detection of podocyte injury*. Biomed Pharmacother, 2007. **61**(5): p. 245-9.
22. Barisoni, L., H.W. Schnaper, and J.B. Kopp, *A proposed taxonomy for the podocytopathies: a reassessment of the primary nephrotic diseases*. Clin J Am Soc Nephrol, 2007. **2**(3): p. 529-42.
23. Nakamura, T., et al., *Urinary excretion of podocytes in patients with diabetic nephropathy*. Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association, 2000. **15**(9): p. 1379-83.
24. Doyonnas, R., et al., *Anuria, omphalocele, and perinatal lethality in mice lacking the CD34-related protein podocalyxin*. J Exp Med, 2001. **194**(1): p. 13-27.
25. Nielsen, J.S. and K.M. McNagny, *The role of podocalyxin in health and disease*. J Am Soc Nephrol, 2009. **20**(8): p. 1669-76.
26. Kanno, K., et al., *Urinary sediment podocalyxin in children with glomerular diseases*. Nephron Clin Pract, 2003. **95**(3): p. c91-9.
27. Asao, R., et al., *Relationships between levels of urinary podocalyxin, number of urinary podocytes, and histologic injury in adult patients with IgA nephropathy*. Clin J Am Soc Nephrol, 2012. **7**(9): p. 1385-93.
28. Trifunovic, A., et al., *Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase*. Nature, 2004. **429**(6990): p. 417-23.
29. Doleris, L.M., et al., *Focal segmental glomerulosclerosis associated with mitochondrial cytopathy*. Kidney Int, 2000. **58**(5): p. 1851-8.
30. Yamagata, K., *Mitochondrial DNA Mutations in Focal Segmental Glomerulosclerosis Lesions*. Journal of the American Society of Nephrology, 2002. **13**(7): p. 1816-1823.

31. Menzies, K.J. and D.A. Hood, *The role of SirT1 in muscle mitochondrial turnover*. Mitochondrion, 2012. **12**(1): p. 5-13.
32. Fang, L., et al., *Autophagy attenuates diabetic glomerular damage through protection of hyperglycemia-induced podocyte injury*. PLoS One, 2013. **8**(4): p. e60546.
33. Wang, W., et al., *Mitochondrial fission triggered by hyperglycemia is mediated by ROCK1 activation in podocytes and endothelial cells*. Cell Metab, 2012. **15**(2): p. 186-200.
34. Hagiwara, M., et al., *Mitochondrial dysfunction in focal segmental glomerulosclerosis of puromycin aminonucleoside nephrosis*. Kidney Int, 2006. **69**(7): p. 1146-52.
35. Glasser, R.J., J.A. Velosa, and A.F. Michael, *Experimental model of focal sclerosis. I. Relationship to protein excretion in aminonucleoside nephrosis*. Lab Invest, 1977. **36**(5): p. 519-26.
36. Ueda, A., et al., *Importance of renal mitochondria in the reduction of TEMPOL, a nitroxide radical*. Mol Cell Biochem, 2003. **244**(1-2): p. 119-24.
37. Garcia Moreira, V., et al., *Cell-free DNA as a noninvasive acute rejection marker in renal transplantation*. Clin Chem, 2009. **55**(11): p. 1958-66.
38. Bauer, M. and B. Pertl, *On targeting cell-free DNA in urine: a protocol for optimized DNA analysis*. Clin Chem, 2009. **55**(4): p. 605-6.
39. Chan, A.K., et al., *Cell-free nucleic acids in plasma, serum and urine: a new tool in molecular diagnosis*. Ann Clin Biochem, 2003. **40**(Pt 2): p. 122-30.
40. Saito, A., et al., *Molecular mechanisms of receptor-mediated endocytosis in the renal proximal tubular epithelium*. Journal of biomedicine & biotechnology, 2010. **2010**: p. 403272.
41. Christensen, E.I. and H. Birn, *Megalin and cubilin: multifunctional endocytic receptors*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(4): p. 256-66.
42. Leheste, J.R., et al., *Megalin knockout mice as an animal model of low molecular weight proteinuria*. Am J Pathol, 1999. **155**(4): p. 1361-70.
43. Kantarci, S., et al., *Mutations in LRP2, which encodes the multiligand receptor megalin, cause Donnai-Barrow and facio-oculo-acoustico-renal syndromes*. Nat Genet, 2007. **39**(8): p. 957-9.
44. Kerjaschki, D. and M.G. Farquhar, *Immunocytochemical localization of the Heymann nephritis antigen (GP330) in glomerular epithelial cells of normal Lewis rats*. J Exp Med, 1983. **157**(2): p. 667-86.

45. Prabakaran, T., et al., *Receptor-mediated endocytosis of alpha-galactosidase A in human podocytes in Fabry disease*. PLoS one, 2011. **6**(9): p. e25065.
46. Prabakaran, T., et al., *Cubilin is expressed in rat and human glomerular podocytes*. Nephrol Dial Transplant, 2012. **27**(8): p. 3156-9.
47. Norden, A.G., et al., *Urinary megalin deficiency implicates abnormal tubular endocytic function in Fanconi syndrome*. J Am Soc Nephrol, 2002. **13**(1): p. 125-33.
48. Thrailkill, K.M., et al., *Microalbuminuria in type 1 diabetes is associated with enhanced excretion of the endocytic multiligand receptors megalin and cubilin*. Diabetes Care, 2009. **32**(7): p. 1266-8.
49. Ogasawara, S., et al., *Significance of urinary full-length and ectodomain forms of megalin in patients with type 2 diabetes*. Diabetes Care, 2012. **35**(5): p. 1112-8.
50. Matsuo, S., et al., *Revised equations for estimated GFR from serum creatinine in Japan*. Am J Kidney Dis, 2009. **53**(6): p. 982-92.
51. Hogan, M.C., et al., *Subfractionation, characterization, and in-depth proteomic analysis of glomerular membrane vesicles in human urine*. Kidney Int, 2014. **85**(5): p. 1225-37.
52. Hara, M., et al., *Apical cell membranes are shed into urine from injured podocytes: a novel phenomenon of podocyte injury*. J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(2): p. 408-16.
53. Kume, S., et al., *Calorie restriction enhances cell adaptation to hypoxia through Sirt1-dependent mitochondrial autophagy in mouse aged kidney*. J Clin Invest, 2010. **120**(4): p. 1043-55.
54. Hara, M., T. Yanagihara, and I. Kihara, *Urinary podocytes in primary focal segmental glomerulosclerosis*. Nephron, 2001. **89**(3): p. 342-7.
55. Hara, M., et al., *Podocyte membrane vesicles in urine originate from tip vesiculation of podocyte microvilli*. Hum Pathol, 2010. **41**(9): p. 1265-75.
56. Nielsen, J.S., et al., *The CD34-related molecule podocalyxin is a potent inducer of microvillus formation*. PLoS One, 2007. **2**(2): p. e237.
57. McConnell, R.E. and M.J. Tyska, *Myosin-1a powers the sliding of apical membrane along microvillar actin bundles*. J Cell Biol, 2007. **177**(4): p. 671-81.
58. Beck, L.H., Jr., et al., *M-type phospholipase A2 receptor as target antigen in idiopathic membranous nephropathy*. N Engl J Med, 2009. **361**(1): p. 11-21.

## 7 図表

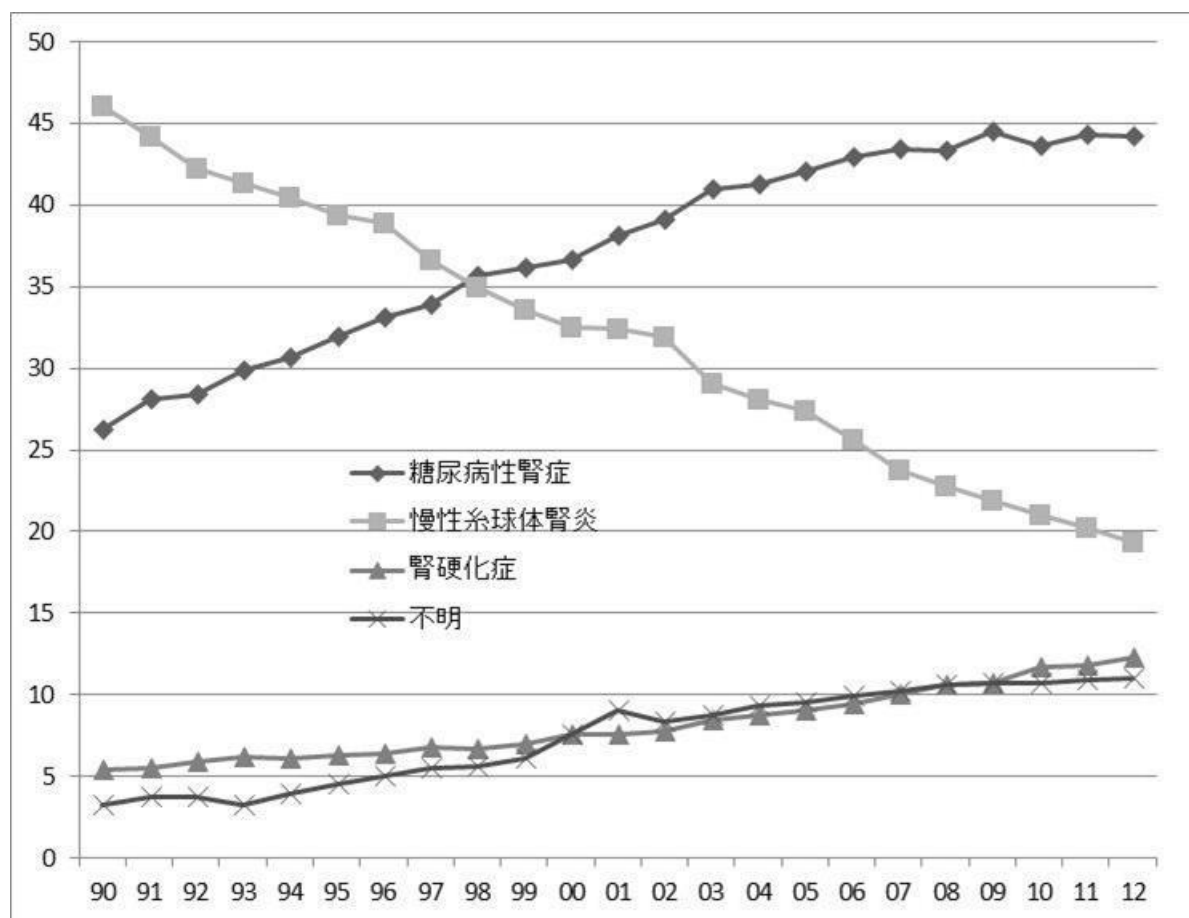


図1 2012年度末の年別透析導入患者の主要原疾患の割合推移

文献1より引用 改変

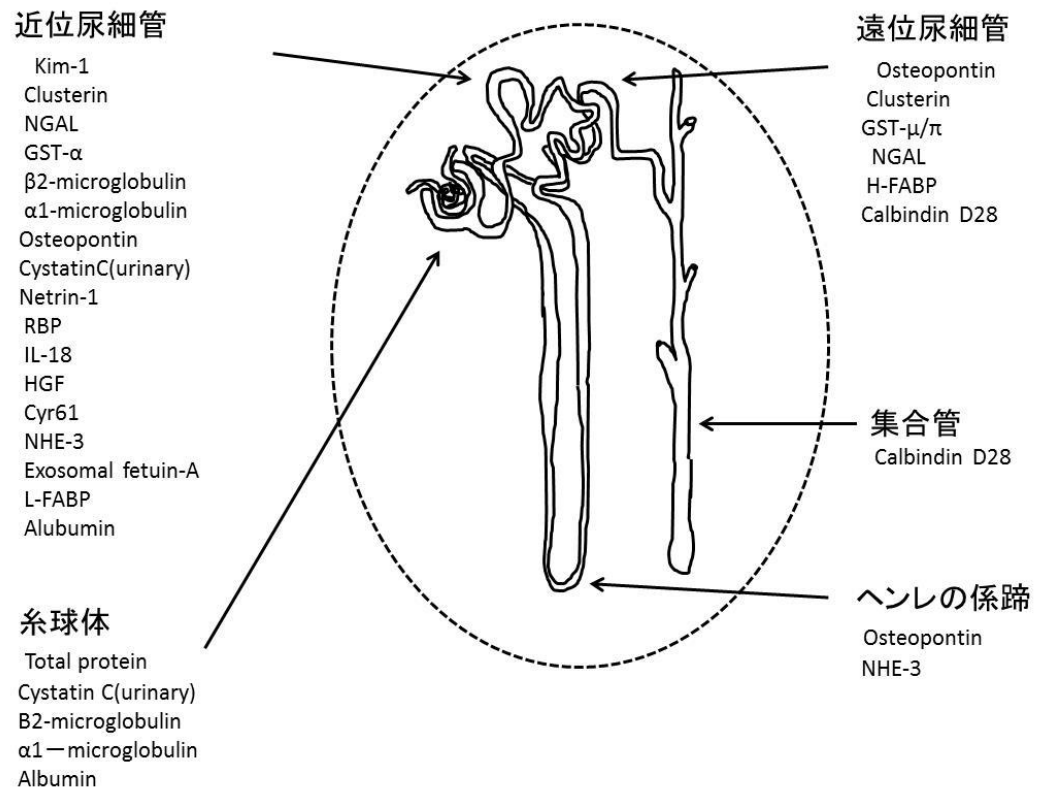


図2 AKIにおけるネフロンセグメント特異的バイオマーカー 文献11より引用 改変

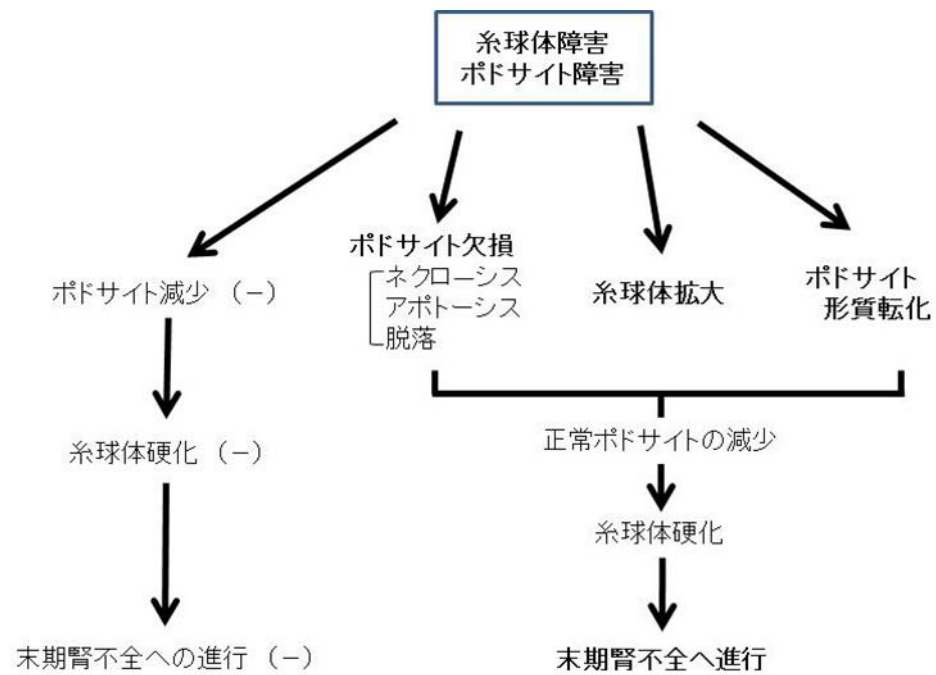


図 3. 糸球体障害から末期腎不全への進展様式

ポドサイトの相対的な減少が糸球体硬化へと進み、末期腎不全に至る

文献 17 より引用 改変

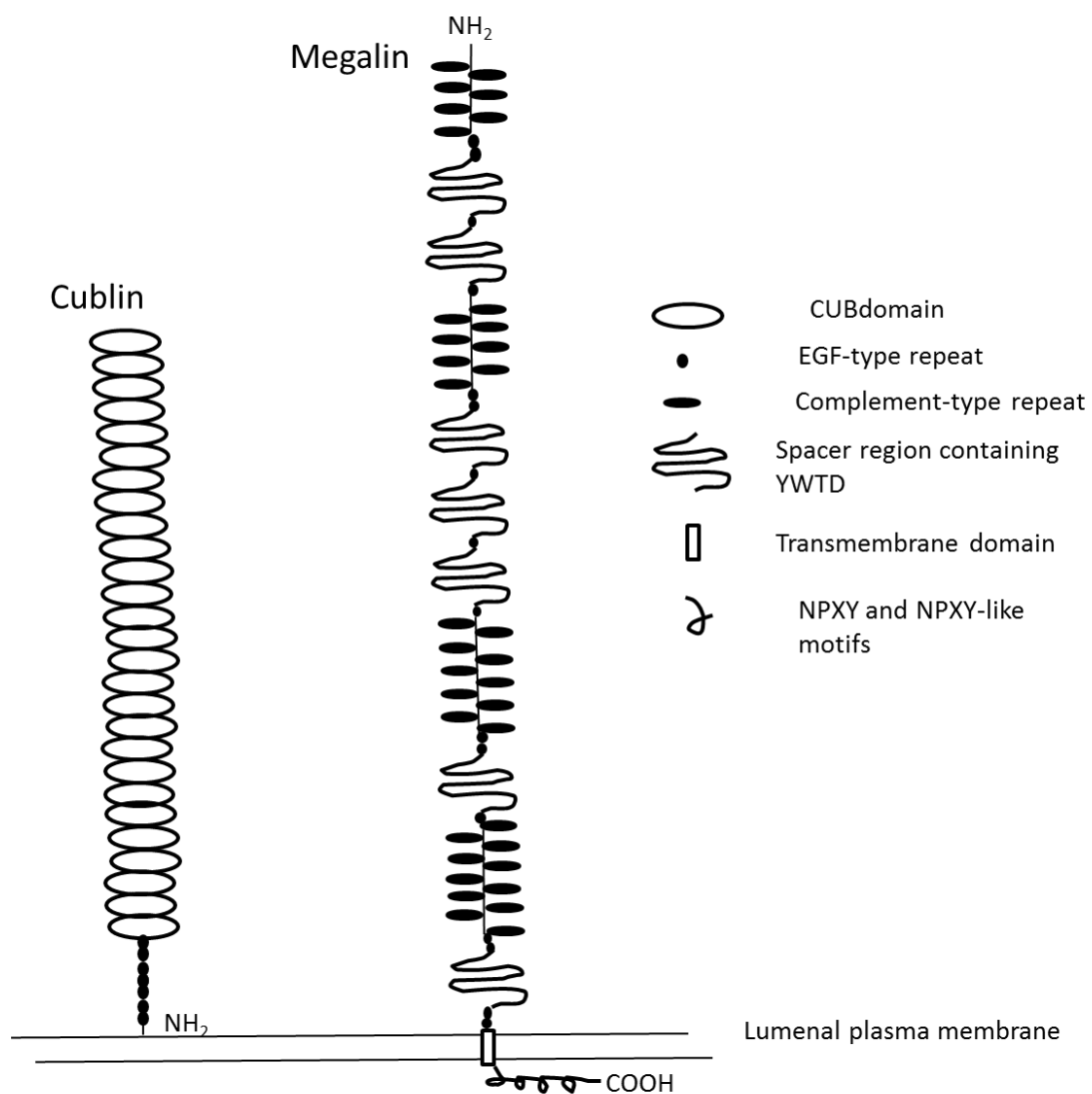


図4 メガリンとキューブリンの構造模式図。文献38より引用 改変

		MN			NSC		P value	DN		P value
n		17			11		(vs MN)	17		(vs MN)
sex	male:female	10	: 7		6	: 5		16	: 1	*
age	(yrs)	63.4	± 9.8		55.6	± 19.1	NS	57.8	± 8.4	NS
urinary protein	(g/gCr)	5.18	± 3.13		4.83	± 3.83	NS	4.91	± 2.61	NS
eGFR	(ml/min/1.73m <sup>2</sup> )	63.3	± 27.9		44.7	± 26.1	NS	22.2	± 22.5	***
Data are expressed as mean ±SD										
*:P value <0.05, **:P value <0.01, ***:P value <0.001										

表 1 研究①患者背景 平均值±SD  
 MGN：膜性腎症、NSC：腎硬化症、DN：糖尿病性腎症



Target				Oligonucleotide sequence								
total mtDNA	F	5'	-	GCT ACC TAA GAA CAG CTA AAA GAG C	-	3'						
	R	5'	-	AAG ATT CTA TCT TGG ACA ACC AGC	-	3'						
	P	FAM	-	ATG TAG CAA AAT AGT GGG AAG A	-	MGB						
18SrRNA	F	5'	-	TGC ATG GCC GTT CTT AGT TG	-	3'						
	R	5'	-	TAG CAT GCC GAG ATG CTC GTT	-	3'						
	P	FAM	-	TGG AGC GAT TTG TCT GGT TAA TTC CGA	-	MGB						

表2 realtimePCR に用いたプライマー、プローブ

F: forward primer, R: reverse primer, P: probe



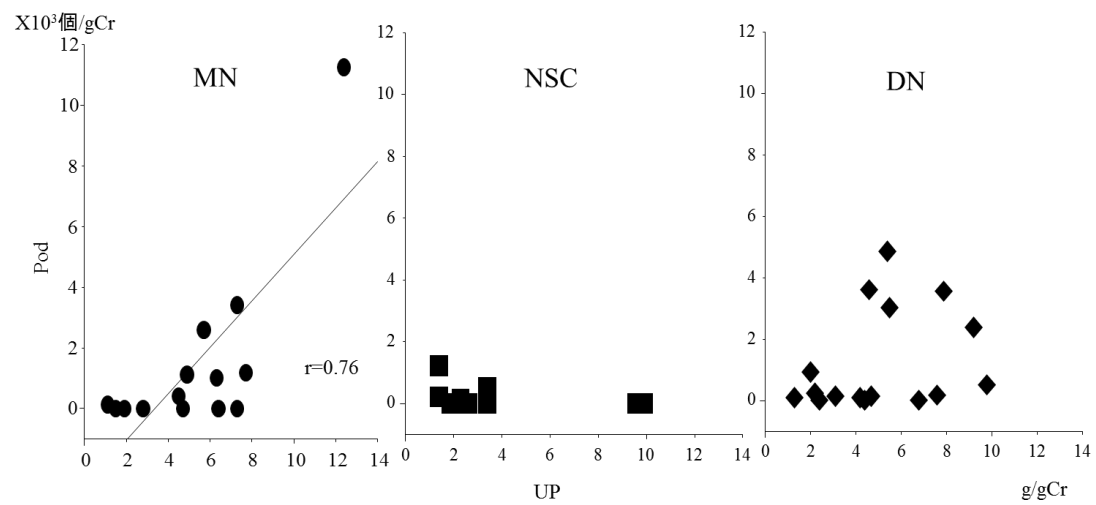


図 6. 尿蛋白(UP)と尿中脱落ポドサイト数(Pod)の関係

膜性腎症において尿中脱落ポドサイト数と尿蛋白の間に正の相関関係 ( $P<0.01$ ) を認めた。

MN：膜性腎症、NSC：腎硬化症、DN：糖尿病性腎症

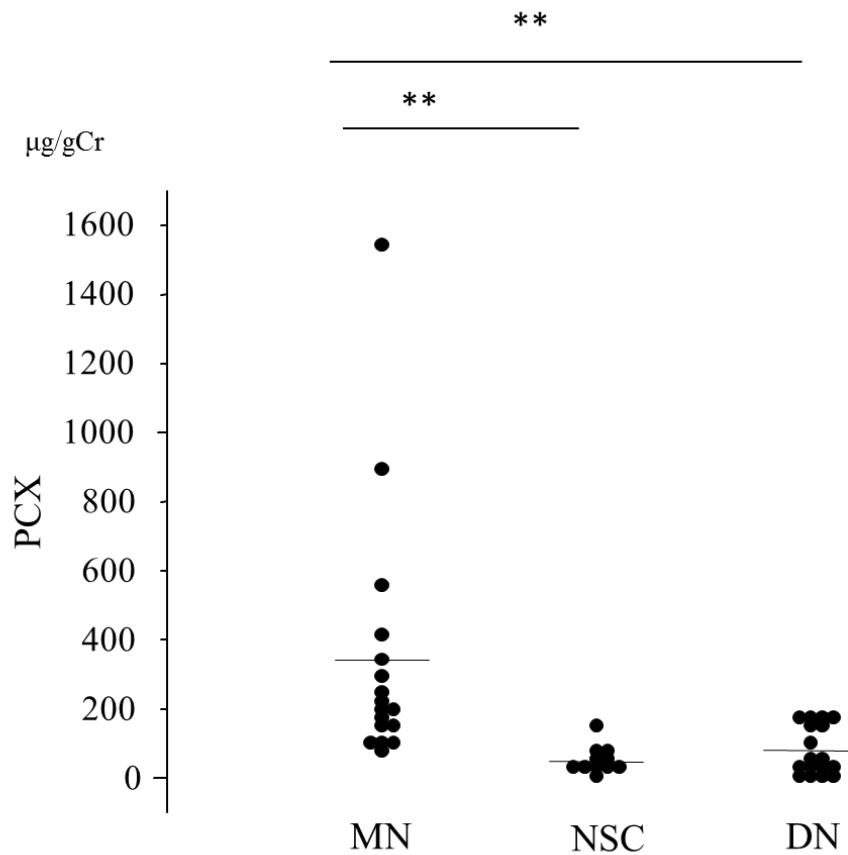


図 7. 疾患群での尿中ポドカリキシン (PCX) の比較

MN：膜性腎症、NSC：腎硬化症、DN：糖尿病性腎症

\*\*P<0.01 Bar は平均値

膜性腎症 PCX = 342.5 ± 369.8 μg/gCr、

腎硬化症 PCX = 48.8 ± 37.5 μg/gCr、

糖尿病性腎症 PCX = 80.6 ± 70.5 μg/gCr

(平均±SD)

であった。

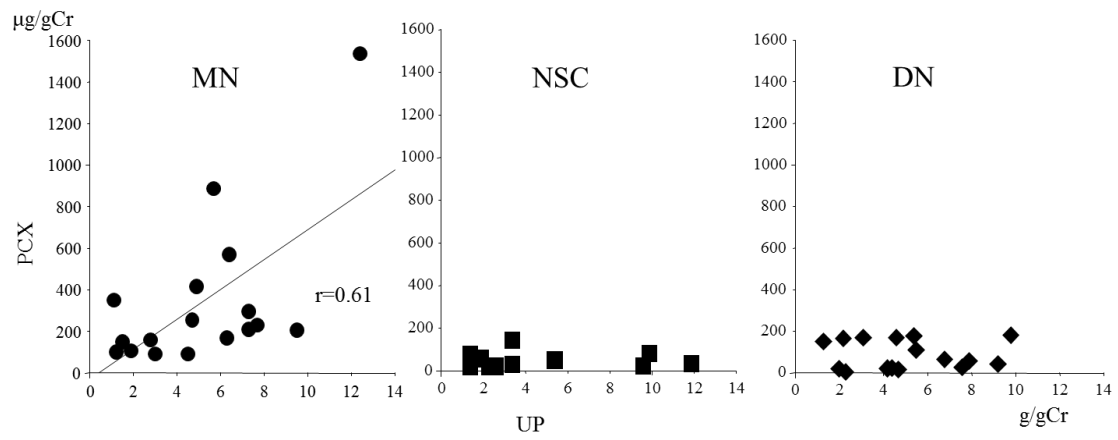


図 8. 尿ポドカリキシン (PCX) と尿蛋白 (UP) の関係

膜性腎症において尿蛋白と PCX の間に正の相関関係を認めた ( $P < 0.01$ )

MN：膜性腎症、NSC：腎硬化症、DN：糖尿病性腎症

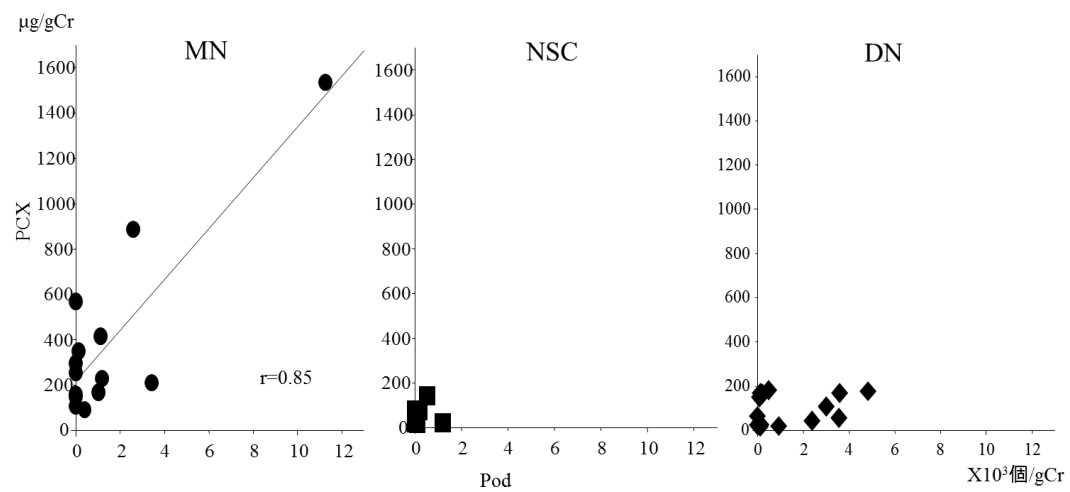


図 9. 尿中脱落ポドサイト数 (Pod) と尿中ポドカリキシン (PCX) の関係  
膜性腎症において尿中脱落ポドサイト数と尿中ポドカリキシンの間に正の相関関係を認めた。 ( $P < 0.001$ )

MN：膜性腎症、NSC：腎硬化症、DN：糖尿病性腎症

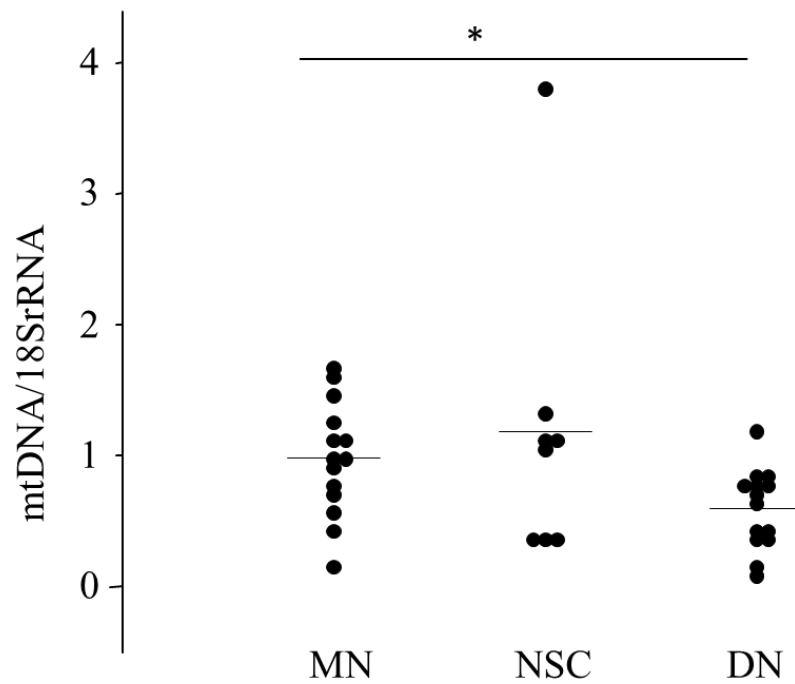


図 10. 尿中脱落ポドサイト中のミトコンドリア DNA 数

\*  $P < 0.05$

MN：膜性腎症、NSC：腎硬化症、DN：糖尿病性腎症 Bar は平均値

膜性腎症 mtDNA/18SrRNA =  $0.98 \pm 0.44$ 、

腎硬化症 mtDNA/18SrRNA =  $1.19 \pm 1.14$ 、

糖尿病性腎症 mtDNA/18SrRNA =  $0.60 \pm 0.31$

(平均±SD)

であった。

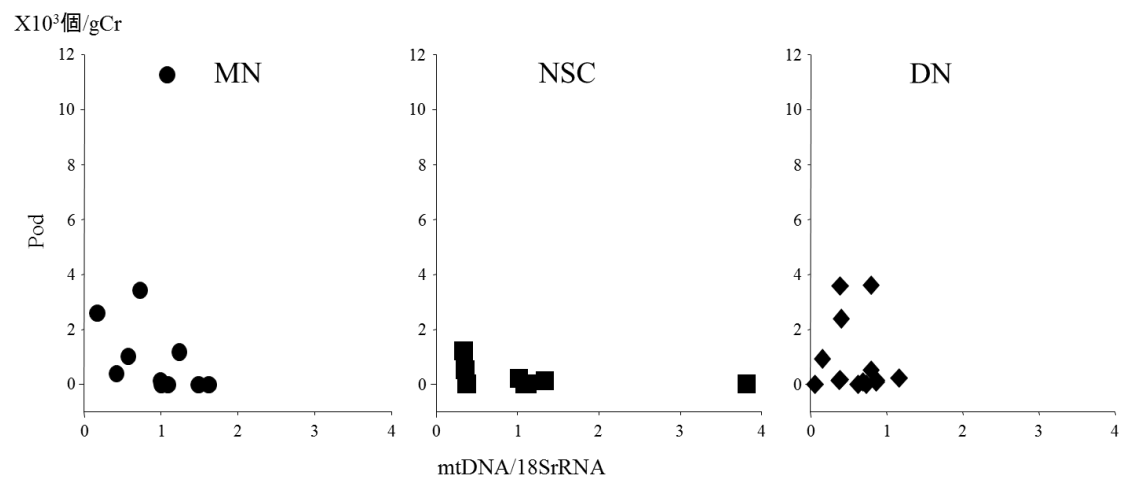


図 11. 脱落ポドサイト中の mtDNA 数(mtDNA/18SrRNA) と脱落ポドサイト数 (Pod) の関係

MN：膜性腎症、NSC：腎硬化症、DN：糖尿病性腎症



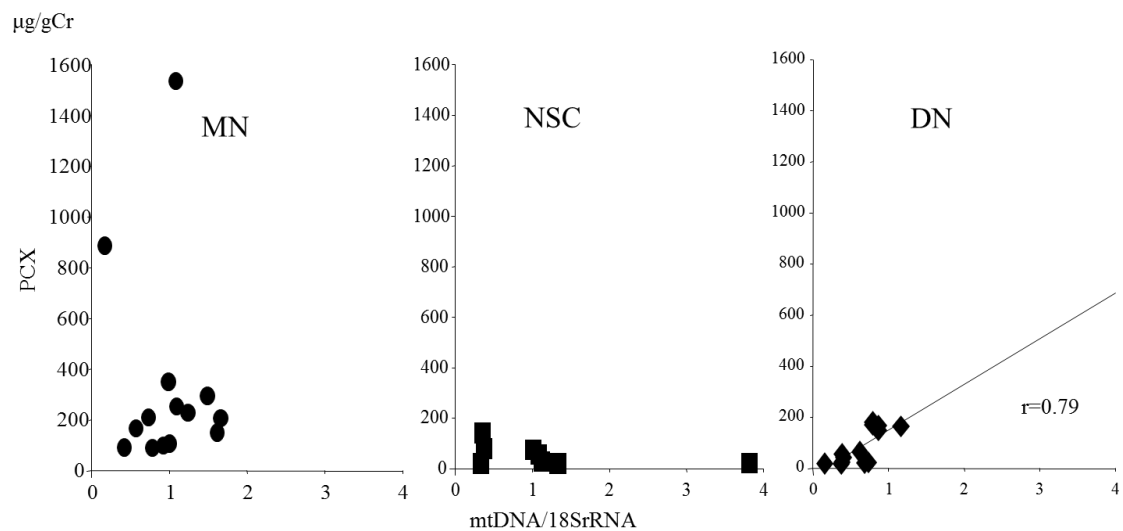


図 12. 尿中脱落ポドサイト中 mtDNA 数(mtDNA/18SrRNA)と尿中ポドカリキシ  
ン (PCX) の関係

糖尿病性腎症において mtDNA/18SrRNA と PCX との間に正の相関関係を認めた。  
( $P < 0.01$ )

MN：膜性腎症、NSC：腎硬化症、DN：糖尿病性腎症

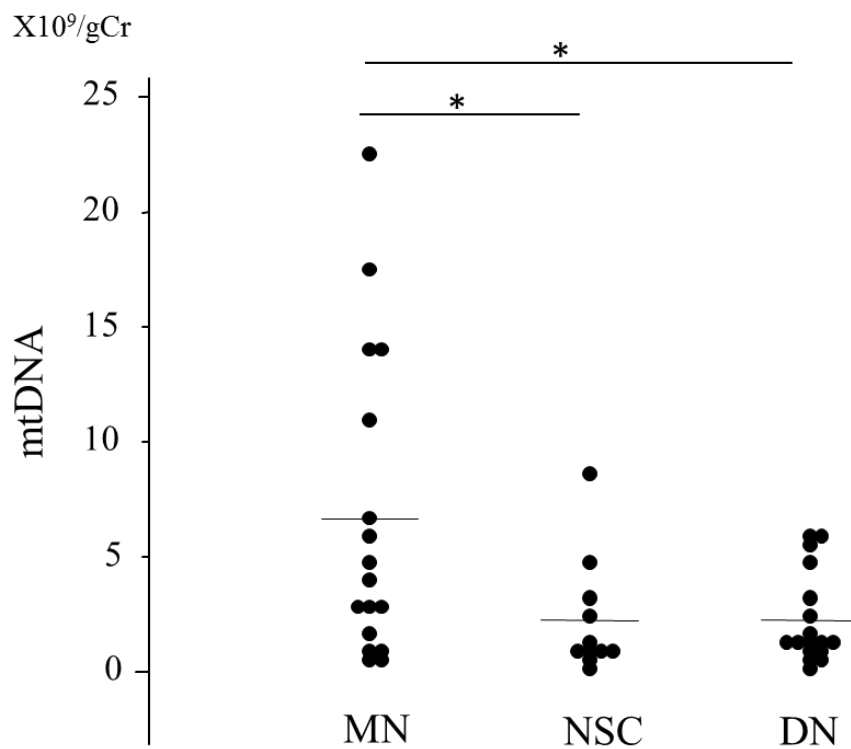


図 13. 疾患群ごとの尿中 free mtDNA 数 (mtDNA) \*P<0.05

MN：膜性腎症、NSC：腎硬化症、DN：糖尿病性腎症 Bar は平均値

膜性腎症 free mtDNA 量 =  $6.64 \pm 6.67 \times 10^9 / \text{gCr}$ 、

腎硬化症 free mtDNA 量 =  $2.25 \pm 2.46 \times 10^9 / \text{gCr}$ 、

糖尿病性腎症 free mtDNA 量 =  $2.26 \pm 1.19 \times 10^9 / \text{gCr}$

(平均±SD  $\times 10^9$ )

であった。

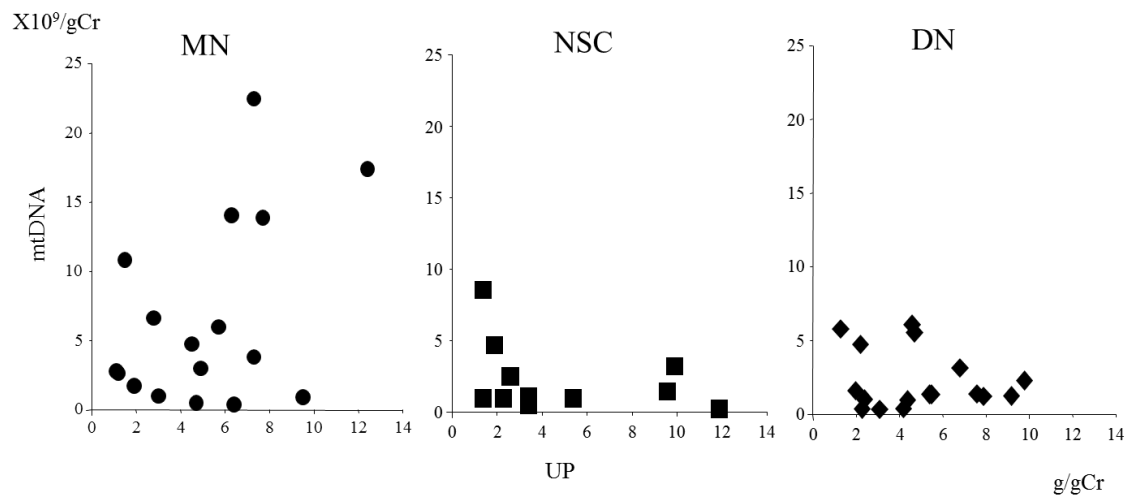


図 14. 尿中 free mtDNA 数と尿蛋白 (UP) の関係

MN：膜性腎症、NSC：腎硬化症、DN：糖尿病性腎症

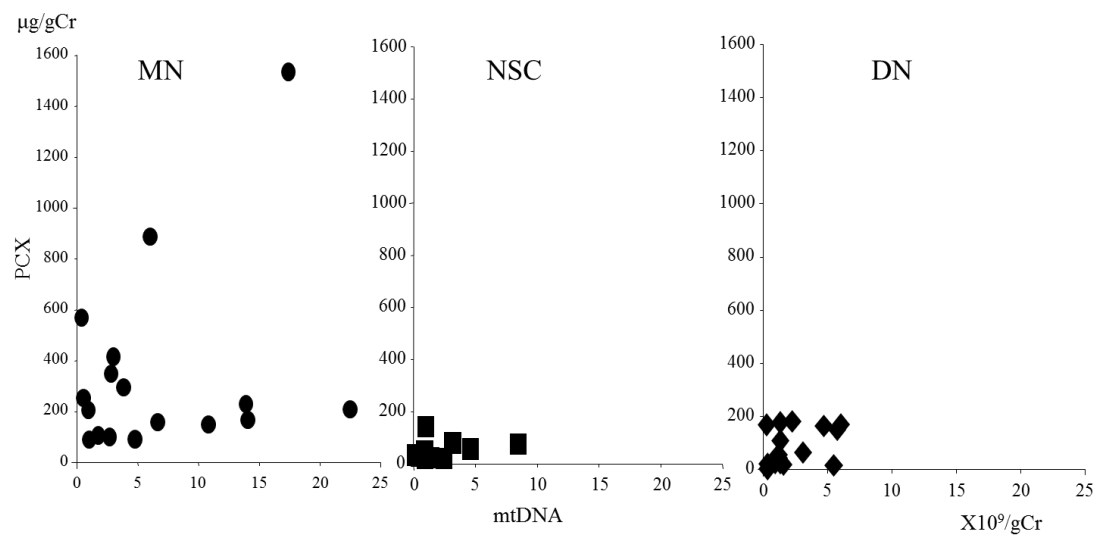


図 15. 尿中 free mtDNA 数と尿中ポドカリキシン (PCX) の関係

MN：膜性腎症、NSC：腎硬化症、DN：糖尿病性腎症

	proteniruria				eGFR			
	r	95% confidence interval	P value		r	95% confidence interval	P value	
PCX	0.612	0.187 –	0.844 **		-0.124	-0.571 –	0.38	NS
podocytes	0.766	0.396 –	0.922 **		-0.428	-0.781 –	0.133	NS
mtDNA/18SrRNA	0.131	-0.429 –	0.619 NS		0.299	-0.276 –	0.716	NS
free mtDNA	0.445	-0.045 –	0.762 NS		-0.434	-0.757 –	0.059	NS
C-megalin	0.569	0.122 –	0.824 *		-0.314	-0.691 –	0.196	NS
A-megalin	-0.178	-0.607 –	0.331 NS		0.644	0.237 –	0.859 **	
NAG	0.541	0.082 –	0.811 *		-0.491	-0.786 –	-0.014 *	
$\alpha$ 1-MG	0.34	-0.168 –	0.706 NS		-0.586	-0.832 –	-0.147 *	
$\beta$ 2-MG	0.228	-0.284 –	0.638 NS		-0.541	-0.811 –	-0.082 *	
*: P value <0.05, **: P value <0.01								

表 3 膜性腎症における尿蛋白、eGFR と各マーカーの関係

NAG : N アセチル- $\beta$ -グルコサミニダーゼ

$\alpha$ 1-MG :  $\alpha$ 1-ミクログロブリン

$\beta$ 1-MG :  $\beta$ 1-ミクログロブリン

		NS	non-NS	CR	healthy control
n		34	18	19	66
Gender (M:F)		19:15	12 : 6	13 : 6	
Age (yr)		65.2 ± 12.9	63.7 ± 11.4	62.7 ± 11.7	31.5 ± 10.3
Sup-PCX	(μg/gCr)	362.7 ± 319.3	113.4 ± 85.6	88.8 ± 59.5	88.7 ± 35.5
Total protein	(g/dl)	5.0 ± 1.0	6.4 ± 0.6	7.1 ± 0.5	
Serum albumin	(g/dl)	2.0 ± 0.7	3.2 ± 0.7	4.1 ± 0.3	
Total cholesterol	(mg/dl)	297 ± 68	231 ± 57	186 ± 28	
LDL-cholesterol	(mg/dl)	181 ± 56	132 ± 45	99 ± 28	
Serum creatinine	(mg/dl)	0.97 ± 0.39	0.90 ± 0.35	0.79 ± 0.14	0.78 ± 0.13
Estimate GFR	(ml/min/1.73m2)	62.6 ± 26.0	67.9 ± 22.8	72.5 ± 11.1	
Urine protein / Creatinine ratio	(g/gCr)	8.3 ± 4.0	1.4 ± 0.8	0.2 ± 0.1	
NAG	(mg/dl)	23.6 ± 22.4	9.6 ± 8.1	3.5 ± 3.0	

表 4 研究② 対象 1 膜性腎症の病期毎と正常コントロールのマーカの結果  
 平均値±SD

NS：ネフローゼ症候群

Non-NS：非ネフローゼレベルの蛋白尿の群 (3.5 g/gCr > 尿蛋白量 > 0.3 g/gCr)

CR：完全寛解 Sup-PCX：尿上清ポドカリキシン NAG:N アセチルグルコサミンダーゼ

		MN	SSNS (MCD)	FSGS	healthy control	P
n		18	8	5	66	
Gender (M:F)		12 : 6	4 : 4	3 : 2		
Age (yr)		65.5 ± 15.0	49.8 ± 26.6	47.0 ± 26.6	31.5 ± 10.3	*
Sup-PCX	(μg/gCr)	347.5 ± 379.1	56.8 ± 61.4	88.2 ± 39.9	88.7 ± 35.5	*, \$, #
Total protein	(g/dl)	4.8 ± 0.9	4.2 ± 0.5	4.4 ± 0.8		
Serum albumin	(g/dl)	1.9 ± 0.6	1.4 ± 0.5	1.8 ± 0.5		
Total cholesterol	(mg/dl)	270 ± 62	389 ± 102	349 ± 131		\$
LDL-cholesterol	(mg/dl)	167 ± 62	282 ± 85	251 ± 126		\$
Serum creatinine	(mg/dl)	1.06 ± 0.35	1.03 ± 0.37	1.12 ± 0.46	0.78 ± 0.13	*
Estimate GFR	(ml/min/1.73m2)	55.4 ± 20.1	62.1 ± 25.8	65.4 ± 34.2		
Urine protein / Creatinine ratio	(g/gCr)	9.7 ± 4.2	9.9 ± 2.9	8.0 ± 3.9		
NAG	(mg/dl)	29.5 ± 24.5	30.2 ± 25.8	37.0 ± 26.4		
						(Welch's test)
\$ indicates p<0.05 between MN and SSNS						
# indicates p<0.05 between MN and FSGS						
* indicates p<0.05 between MN and healthy control						

表 5 研究② 対象 2 患者背景と各種マーカー 平均値±SD

MN：膜性腎症

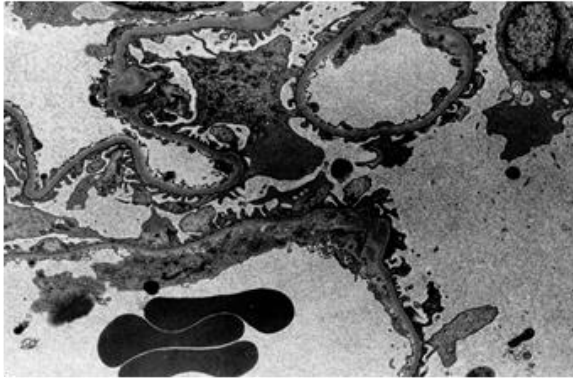
SSNS：ステロイド反応性ネフローゼ症候群

MCD: 微小変化型ネフローゼ症候群

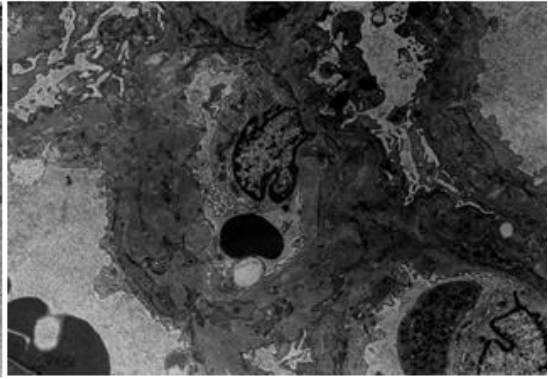
FSGS: 巣状糸球体硬化症

Sup-PCX：尿上清ポドカリキシン NAG:N アセチルグルコサミニダーゼ

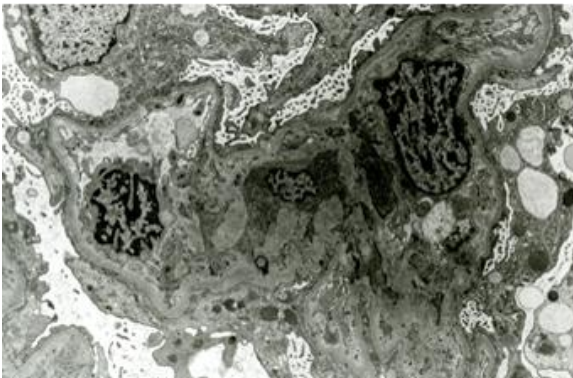
Score 0



Score 1



Score 2



Score 3

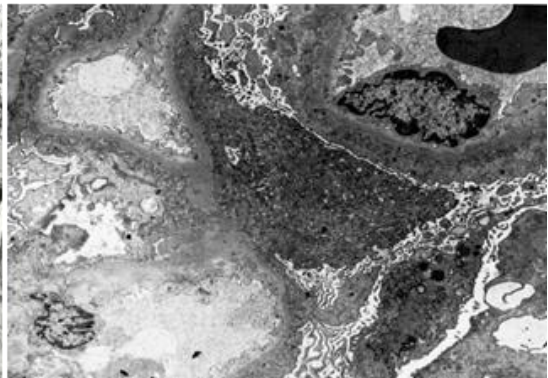


図 16. 電子顕微鏡によるポドサイトでの微絨毛変化スコア

Score0：微絨毛変化がほとんどない

Score1：微絨毛変化が軽度みられる

Score2：微絨毛変化が多くみられる

Score3：微絨毛変化が非常に多くみられる

というように電子顕微鏡写真をスコア化した。



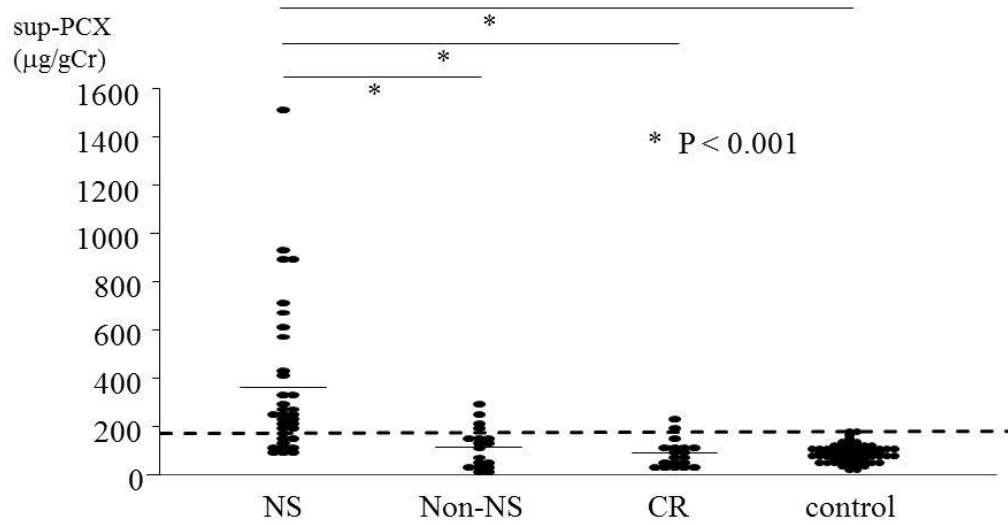


図 17. 膜性腎症患者における疾患活動度とポドカリキシン (PCX) 値の関係

NS: ネフローゼ症候群

Non-NS: 非ネフローゼレベルの蛋白尿の群 (3.5 g/gCr > 尿蛋白量 > 0.3 g/gCr)

CR: 寛解

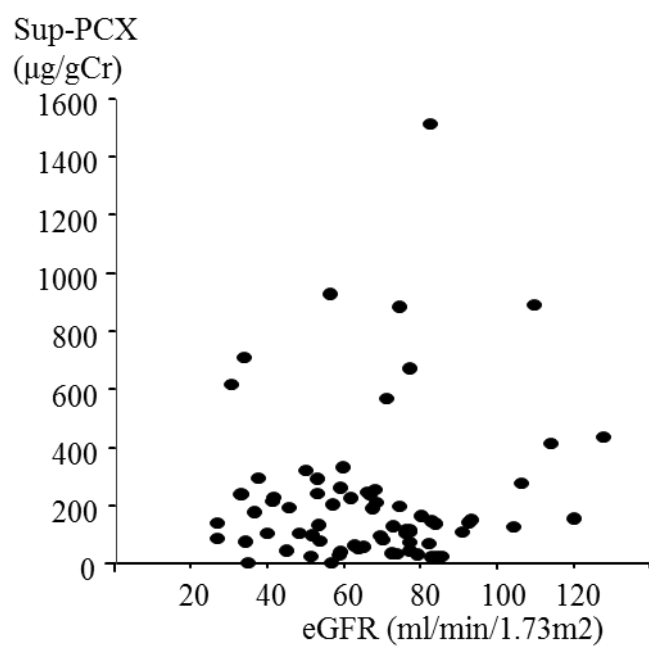


図 18. 尿上清中ポドカリキシシ (Sup-PCX) 排泄量と腎機能 (eGFR) との関係

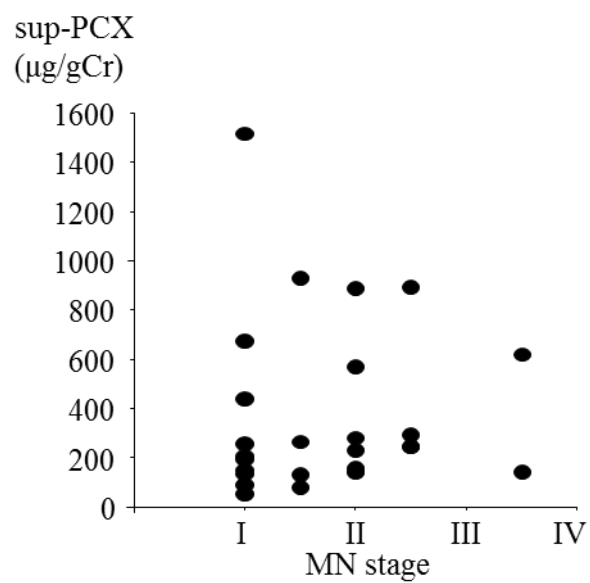


図 19. Ehrenreich&Churg の分類と、尿上清中ポドカリキシン (sup-PCX) 排泄量

グラフ左から I , I ~ II , II , II ~ III , III , III ~ IV , IV

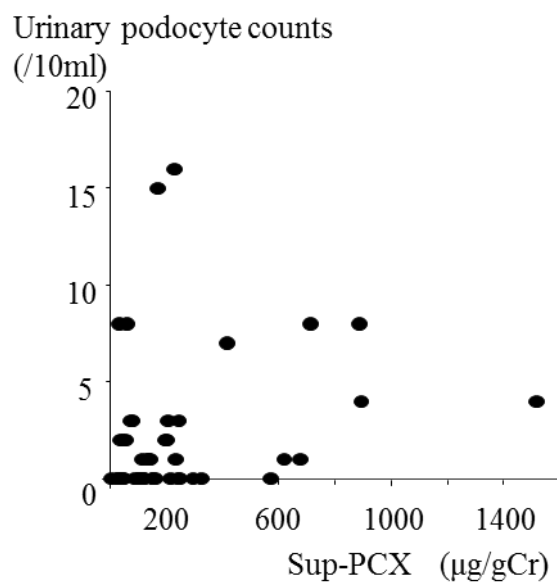


図 20. 尿上清ポドカリキシン (sup-PCX) と尿中脱落ポドサイト数

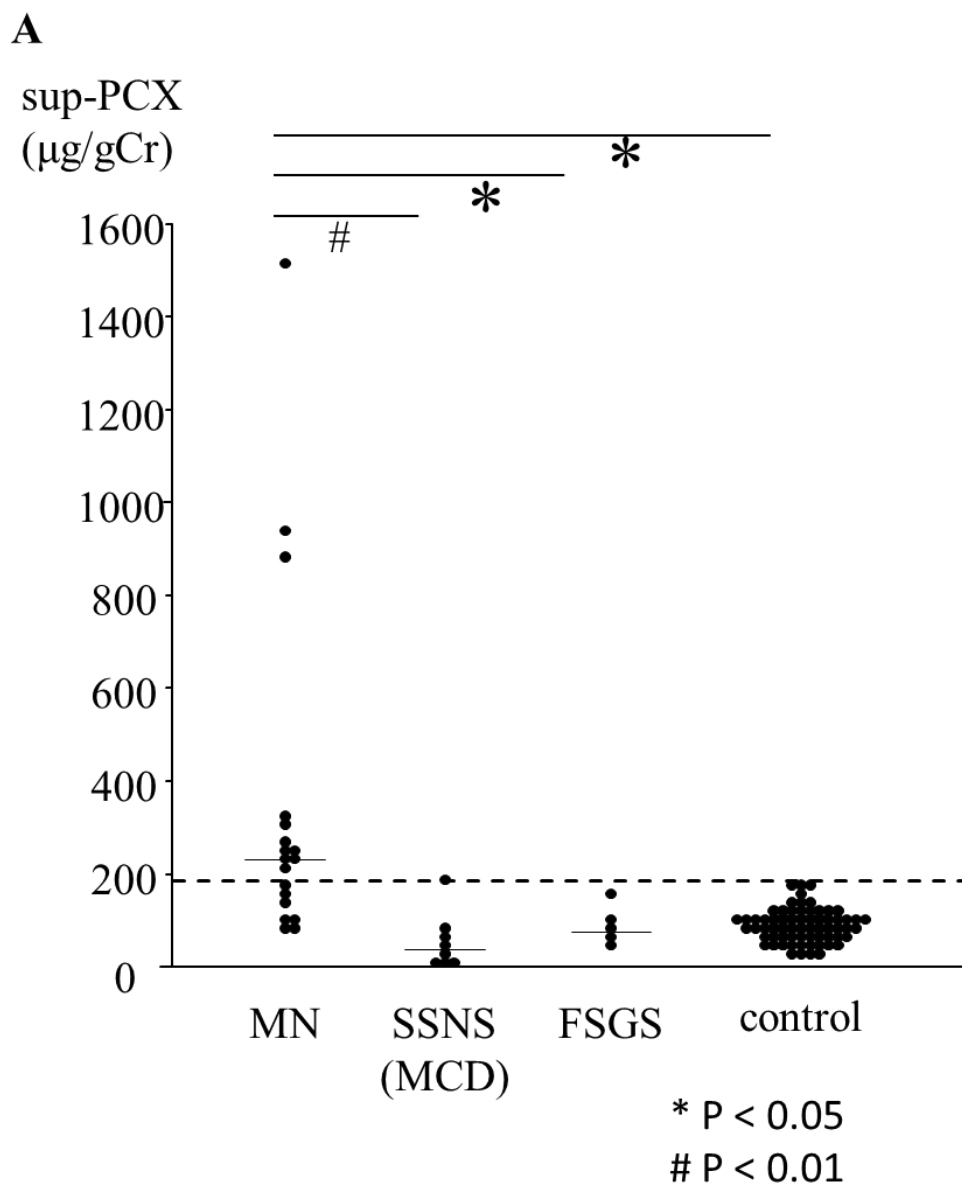


図 21. ネフローゼ症候群の疾患毎の尿上清ポドカリキシン (sup-PCX) 値と正常コントロールにおける値との比較

MN：膜性腎症

SSNS：ステロイド反応性ネフローゼ症候群

MCD: 微小変化群ネフローゼ症候群

FSGS: 巣状糸球体硬化症

## B

### Urinary podocyte counts

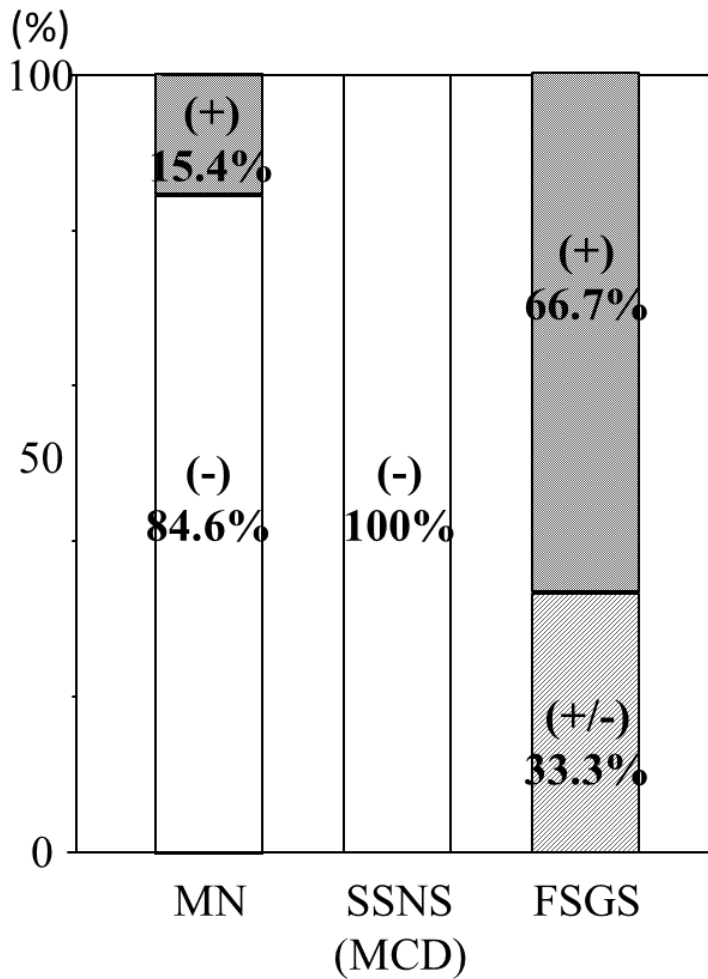


図 22. 疾患ごとの尿中脱落ポドサイト陽性の割合

尿中脱落ポドサイト 10 個/10ml 以上を陽性(+)としたときの疾患群における+、  
-、+/- (=10 個/10ml) の割合を示した。

MN：膜性腎症

SSNS：ステロイド反応性ネフローゼ症候群

MCD: 微小変化型ネフローゼ症候群

FSGS: 巣状糸球体硬化症

No	Sup-PCX	ultra-sup-PCX	sup UP	ultra-sup UP
	( $\mu\text{g/gCr}$ )	( $\mu\text{g/gCr}$ )	( $\text{g/gCr}$ )	( $\text{g/gCr}$ )
1	543	0	2.9	2.1
2	137	0	4.2	3.8
3	83	0	6.6	5.1
4	167	0	7.2	5.8
5	233	0	6.8	6.1

表 6. 膜性腎症患者における尿上清ポドカリキシン (sup-PCX) と超遠心上清ポドカリキシン (ultra-sup-PCX) の比較

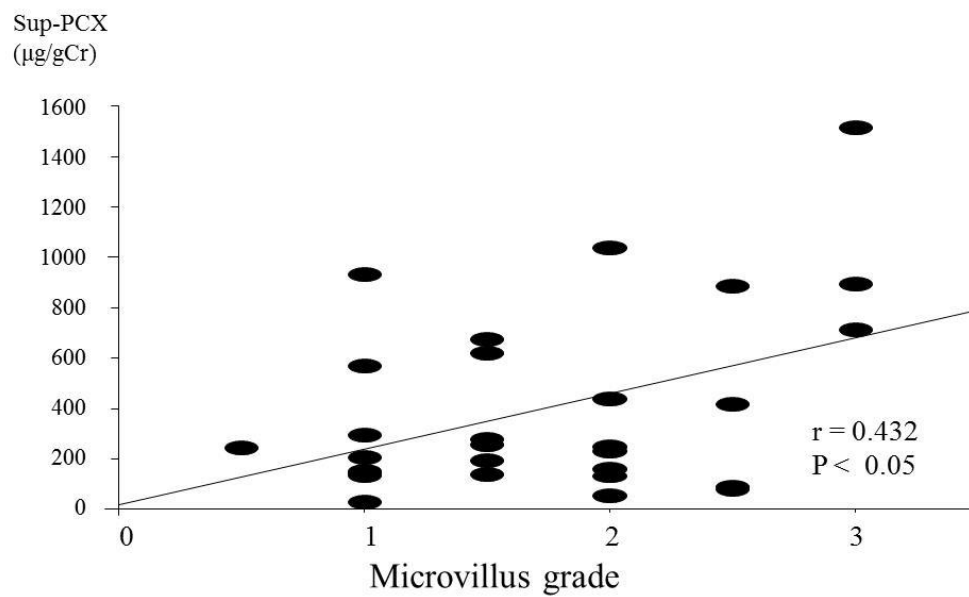


図 23. 電顕で見られるポドサイトにおける微絨毛変化の程度と尿 PCX 値  
 微絨毛変化と尿 PCX の関係に正の相関がみられた。  
 横軸は微絨毛変化のグレード